

Agosto
2014



*Revista Brasileira de
Ginecologia e Obstetrícia*

RBGO

volume 36
n° 8

NOVO



stezza® acetato de nomegestrol/estradiol

Chegou o primeiro contraceptivo oral combinado com hormônios semelhantes aos produzidos naturalmente pela mulher^{1,2}

em regime monofásico

Acetato de nomegestrol¹

Estrogênio estruturalmente idêntico ao natural
17β estradiol¹



Regime monofásico de **24+4** com alta eficácia contraceptiva^{1,3,4}

Períodos curtos de sangramento^{1,3,4}

Disponível em duas apresentações, com 1 ou 3 blísteres

Cartela com 28 comprimidos:
• 24 comprimidos ativos
• 4 comprimidos de placebo



Uma nova opção para as iniciantes da contracepção oral combinada.^{1,2}



Referências Bibliográficas: 1. Circular aos Médicos (bula) de STEZZA. São Paulo; Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda., 2014. 2. Diário Oficial da União. Ofício de aprovação de registro de medicamento novo: STEZZA. Disponível em: <http://www.in.gov.br/autenticidade.html> [código de verificação: 10102014033100180]. Acesso em abril de 2014. 3. Mansour D, Verhoeven C, Sommer W, et al. Efficacy and tolerability of a monophasic combined oral contraceptive containing nomegestrol acetate and 17β-estradiol in a 24/4 regimen, in comparison to an oral contraceptive containing ethinyl estradiol and drospirenone in a 21/7 regimen. Eur J Contracept Reprod Health Care 2011;16(6):430-443. 4. Westhoff C, Kaulitz AM, Kovner T, et al. Efficacy, safety, and tolerability of a monophasic oral contraceptive containing nomegestrol acetate and 17β-estradiol. A randomized controlled trial. Obstet Gynecol 2012;119:989-999.

STEZZA (acetato de nomegestrol/estradiol). INDICAÇÃO: anticoncepção oral. **CONTRAINDICAÇÕES:** hipersensibilidade aos princípios ativos ou excipientes; presença ou histórico de trombose venosa (TV), trombose arterial (TA) ou condições prodrômicas, acidente vascular cerebral (AVC), histórico de enxaqueca com sintomas neurológicos focais, um fator de risco grave ou fatores de risco múltiplos para TV ou TA como: diabetes mellitus (DM) com sintomas vasculares; hipertensão grave; dislipoproteinemia grave. Predisposição hereditária ou adquirida para TV ou TA, como resistência à proteína C ativada, deficiência de antitrombina-III, deficiência de proteína C, deficiência de proteína S, hiperhomocitemia e anticorpos antifosfolípidos. Pancreatite ou histórico de pancreatite associado à hipertrigliceridemia grave. Presença ou histórico de doença hepática grave enquanto os valores de função hepática não retornarem ao normal. Presença ou histórico de tumores hepáticos. Presença ou suspeita de malignidades influenciadas por esteroides sexuais. Gravidez ou suspeita de gravidez. **ADVERTÊNCIAS:** Distúrbios circulatórios: o uso de AHCOS é associado a um aumento do risco de tromboembolismo venoso (TEV) em comparação ao não uso. O risco TEV é maior durante o primeiro ano de uso. Estudos epidemiológicos demonstraram que a incidência de TEV em mulheres sem fator de risco conhecido para TEV que utilizam AHCOS com EE em baixa dose (< 50 mcg) varia de 20 a 40 casos por 100.000 mulheres-anos, comparada com 5 a 10 casos por 100.000 mulheres-anos para não usuárias e 60 casos por 100.000 casos de gravidez. Estudos epidemiológicos associaram ao uso de AHCOS um maior risco de tromboembolia arterial (TEA). Há relatos da ocorrência de trombose em outros vasos em usuárias de AHCOS (por exemplo: veias e artérias hepáticas, mesentéricas, renais, cerebrais ou retinianas). O risco de eventos tromboembólicos venosos cresce com o aumento da idade; histórico familiar (HF) positivo; imobilização prolongada; cirurgia de grande porte; qualquer cirurgia nas pernas; ou grande trauma; obesidade. O risco de complicações tromboembólicas arteriais ou de AVC cresce com o aumento da idade; tabagismo; dislipoproteinemia; obesidade; hipertensão; enxaqueca; doença cardíaca valvular; fibrilação atrial; HF positivo. Outras condições associadas a eventos adversos circulatórios: DM, lúpus eritematoso sistêmico (LES), síndrome hemolítica urêmica, doença intestinal inflamatória crônica e anemia falciforme. Aumento na frequência ou gravidade da enxaqueca durante uso de AHCOS pode ser razão para descontinuação imediata de STEZZA. Em caso de ocorrência ou suspeita de trombose, o AHCOS deve ser descontinuado. Tumores: o fator de risco mais importante para câncer de colo de útero é infecção pelo papilomavírus humano (HPV); estudos epidemiológicos indicaram que o uso prolongado de AHCOS com EE contribui para esse aumento de risco. Com o uso de AHCOS de doses mais altas (50 mcg EE) o risco de câncer endometrial e de ovário é reduzido. É preciso confirmar se isto se aplica aos AHCOS com 17β-estradiol. Uma metanálise de 54 estudos epidemiológicos relatou aumento discreto do risco relativo (RR = 1,24) de câncer de mama em mulheres em uso de AHCOS com EE. Em usuárias de AHCOS, houve relatos de tumores hepáticos benignos e malignos. Em casos isolados, esses tumores causaram hemorragia intra-abdominal potencialmente fatal. Em caso de dor abdominal superior intensa, hepatomegalia ou sinais de hemorragia intra-abdominal em usuárias de AHCOS, considerar a presença de tumor hepático no diagnóstico diferencial. Outras condições: pacientes com HF ou hipertrigliceridemia têm maior risco de pancreatite ao utilizarem AHCOS. Se hipertensão sustentada se desenvolver durante o uso de AHCOS, suspender AHCOS e tratar a hipertensão. Em sete estudos clínicos multicêntricos de até dois anos de duração, não foram observadas alterações relevantes de pressão arterial com STEZZA. A ocorrência ou piora das seguintes condições foi relatada na gestação e durante o uso de AHCOS: icterícia e/ou prurido relacionado à colestase; formação de cálculos biliares; porfiria; LES; síndrome hemolítica urêmica; coreia de Sydenham; herpes gestacional; perda de audição relacionada à otosclerose. Em mulheres com angioedema hereditário, pode ocorrer inchaço ou exacerbção de estrogênios exógenos. Distúrbios agudos ou crônicos da função hepática podem requerer a descontinuação do uso do AHCOS. Recorrência de icterícia colestática que ocorreu pela primeira vez durante a gestação ou uso anterior de esteroides sexuais requer a descontinuação do uso dos AHCOS. Os AHCOS podem apresentar efeitos sobre a resistência periférica à insulina e tolerância à glicose. Mulheres com diabetes devem ser criteriosamente monitoradas. STEZZA não apresentou efeito sobre a resistência periférica à insulina e sobre a tolerância à glicose em mulheres saudáveis. Agravamento da depressão, doença de Crohn e colite ulcerativa foram associadas ao uso de AHCOS. Ocasionalmente pode ocorrer cistite. Pacientes com raras doenças hereditárias de intolerância à lactose ou má-absorção de glicose-galactose não devem tomar este medicamento. **INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS:** interações entre anticoncepcionais orais e medicamentos indutores enzimáticos podem causar sangramento inesperado e falha anticonceptiva. Exemplos: fenitina, fenobarbital, primidona, bosentan, carbamazepina, ritonavir e medicamentos ou preparações à base de plantas contendo enzima-de-são-jão, coxibazepina, topiramato, felbamato e griseofulvina. Inibidores da protease HIV com um potencial indutor e inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa. Estudos de interação medicamentosas não foram realizados com STEZZA, mas dois estudos com ritonavir e ceftriaxona, respectivamente, foram realizados com doses mais elevadas de combinação de acetato de nomegestrol-estradiol (acetato de nomegestrol 3,75 mg + 1,5 mg de estradiol) em mulheres na pós-menopausa. O uso concomitante de ritonavir diminui a AUC_{0-∞} de acetato de nomegestrol em 95% e aumenta a AUC_{0-∞} último de estradiol em 25%. O uso concomitante de ceftriaxona (dose única de 200 mg) não modifica o metabolismo do estradiol, enquanto foram observados aumentos de concentração de pico (85%) e de AUC_{0-∞} (115%) de acetato de nomegestrol, os quais não tiveram relevância clínica. Os anticoncepcionais orais podem afetar o metabolismo de outros medicamentos. Dar atenção especial para a interação com lamotrigina. **REAÇÕES ADVERSAS:** muito comuns (≥ 1/10); acne (cística, oleosa), sangramento de privação anormal (menstruação irregular, menstruação atrasada, polimenorreia); comuns (≥ 1/100 a < 1/10); diminuição da libido, perda da libido, depressão/humor deprimido (depressão maior, depressão pós-parto, sintoma depressivo, diminuição do interesse, choro), humor alterado (oscilações de humor, distúrbio emocional, raiva, apatia, indolência, sofrimento emocional, instabilidade emocional, transtorno afetivo), cefaleia (tensional, sinus), enxaqueca, enxaqueca com aura, náusea, metrorragia (menometrorragia, hemorragia vaginal), menorragia, dor/disconforto/sensibilidade nas mamas, dor pélvica, desconforto pélvico, aumento de peso, aumento do índice de massa corporal; incomuns (≥ 1/1.000 a < 1/100); aumento de apetite, desejo por alimentos, retenção hídrica, fôlego, distensão abdominal, flatulência, hipertensão, sudorese noturna, alopecia, alopecia androgênica, prurido, prurido alérgico, pele seca, seborreia, sensação de peso, hipomenorreia, oligomenorreia, indolência/aumento da mama, edema da mama, ingurgitamento da mama, galactorreia (secreção mamária), espasmo uterino, síndrome pré-menstrual, massa na mama, dispareunia ressecamento vulvovaginal, lubrificação inadequada, irritabilidade, edema (periférico, generalizado e localizado), aumento de enzimas hepáticas; raras (≥ 1/10.000 a < 1/1.000); diminuição do apetite, aumento da libido, distúrbio de atenção, intolerância à lente de contato/olho ressecado, tosse seca, cistite, hipertricose, odor vaginal, desconforto/dor vulvovaginal, fome. A acne foi evento cujo relato foi isolado, isto é, não foi relatado espontaneamente, sendo determinado em todas as visitas de estudo. Adicionalmente têm sido relatadas reações de hipersensibilidade em usuárias de STEZZA (irritação desconfortável). **POSOLOGIA E ADMINISTRAÇÃO:** um comprimido diariamente, por 28 dias consecutivos. Uma cartela subsequente é iniciada imediatamente após o término da embalagem anterior, sem interrupção na ingestão diária de comprimidos e independentemente da presença ou ausência de sangramento de privação. **VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA. REGISTRO MS: 1.0029.0186.**

Nota: antes de prescrever STEZZA, recomendamos a leitura da Circular aos Médicos (bula) completa para informações detalhadas sobre o produto. STEZZA é marca registrada de Laboratório Theramex.

Dentre as informações citadas em bula, ressaltamos que este medicamento é contraindicado para usuárias com presença ou histórico de trombose venosa (trombose venosa profunda, embolia pulmonar), de trombose arterial (p.ex., infarto do miocárdio) ou condições prodrômicas (p.ex., crise isquêmica transitória, angina pectoris). Interações entre anticoncepcionais orais e medicamentos indutores enzimáticos podem causar sangramento inesperado e falha anticonceptiva.

A PERSISTEM OS SINTOMAS, O MÉDICO DEVE SER CONSULTADO.



Copyright © 2013 Merck Sharp & Dohme Corp., subsidiária da Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, EUA. Todos os direitos reservados. WOMN-1076728-0001 08/13

08-2015-STE-14-BR-U WOMN-1124205-000 IMPRESSO EM JUNHO 2014

RBGO

Publicação mensal
ISSN 0100-7203

Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia

Órgão Oficial de Divulgação Científica da Federação Brasileira das
Associações de Ginecologia e Obstetrícia

Rev Bras Ginecol Obstet v. 36, n. 8, p. 335-382, agosto 2014



Publicação indexada na Base de
Dados LILACS e SciELO. Disponível
eletronicamente no SciELO www.scielo.br/rbgo nas versões
português e inglês



Indexada na Base de
Dados Medline

SCOPUS

Acesso eletrônico através da Scopus:
www.scopus.com/scopus/home.url

Editor Científico

Jurandyr Moreira de Andrade (Ribeirão Preto/SP)

Editores Associados

Eliana Martorano Amaral (Campinas/SP)
Geraldo Duarte (Ribeirão Preto/SP)
João Luiz Pinto e Silva (Campinas/SP)
José Maria Soares Junior (São Paulo/SP)

Marilza Vieira Cunha Rudge (Botucatu/SP)
Rosiane Mattar (São Paulo/SP)
Rossana Pulcinelli Vieira Francisco (São Paulo/SP)
Sophie Françoise Mauricette Derchain (Campinas/SP)

Editor Executivo

Daniel Guimarães Tiezzi (Ribeirão Preto/SP)

Conselho Editorial

Antonio Alberto Nogueira (Ribeirão Preto/SP)
Antonio Jorge Salomão (São Paulo/SP)
Carlos Augusto Alencar Jr. (Fortaleza/CE)
Eddie Fernando Candido Murta (Uberaba/MG)
Edmund Chada Baracat (São Paulo/SP)
Francisco Mauad Filho (Ribeirão Preto/SP)
Geraldo Duarte (Ribeirão Preto/SP)
Gutemberg Leão de Almeida Filho (Rio de Janeiro/RJ)
Haroldo Capurro Alzola (Montevideo, Uruguay)
Iracema de Mattos Paranhos Calderon (Botucatu/SP)
Ivo Behle (Porto Alegre/RS)
Jesus de Paula Carvalho (São Paulo/SP)
Jon Oyvind Odland (Tromsø, Norway)
José Carlos Peraçoli (Botucatu/SP)
José Geraldo Lopes Ramos (Porto Alegre/RS)
José Guilherme Cecatti (Campinas/SP)
José Meirelles Filho (Cuiabá/MT)
Joseph A. Spinnato, II (Cincinnati, Ohio)
Krikor Boyaciyán (São Paulo/SP)
Luiz Carlos Zeferino (Campinas/SP)
Luiz Gerk de Azevedo Quadros (São Paulo/SP)
Luiz Henrique Gebrim (São Paulo/SP)

Manoel J. B. Castello Girão (São Paulo/SP)
Manuel de Jesus Simões (São Paulo/SP)
Marair Gracio Ferreira Sartori (São Paulo/SP)
Marcelo Zugaib (São Paulo/SP)
Marcos Felipe Silva de Sá (Ribeirão Preto/SP)
Maria de Lourdes Brizot (São Paulo/SP)
Marilza Vieira Cunha Rudge (Botucatu/SP)
Melania Maria Ramos de Amorim (Campina Grande/PB)
Nilma Antas Neves (Salvador/BA)
Paulo Traiman (Botucatu/SP)
Ricardo Mello Marinho (Belo Horizonte/MG)
Roseli Mieko Yamamoto Nomura (Santo André/SP)
Ruffo de Freitas Júnior (Goiânia/GO)
Rui Alberto Ferriani (Ribeirão Preto/SP)
Sebastião Freitas de Medeiros (Cuiabá/MT)
Selmo Geber (Belo Horizonte/MG)
Sérgio Hofmeister de Almeida Martins Costa (Porto Alegre/RS)
Sérgio Mancini Nicolau (São Paulo/SP)
Técia Maria de Oliveira Maranhão (Natal/RN)
Victor Hugo de Melo (Belo Horizonte/MG)
Wagner José Gonçalves (São Paulo/SP)
Wellington de Paula Martins (Ribeirão Preto/SP)

SECRETÁRIA EXECUTIVA

Rosane Aparecida Cunha Casula

REVISORA DE REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Maria Cristina Manduca Ferreira

RBGO

Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia

Órgão Oficial de Divulgação Científica da Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia

RBGO – EDITORIA

Av. Bandeirantes, 3900 – 8º andar – Campus Universitário
14049-900 – Ribeirão Preto/SP
Fone (16) 3602-2803 – FAX (16) 3633-0946

Expediente

REVISTA BRASILEIRA DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA, ISSN 0100-7203, é uma publicação mensal da Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. A responsabilidade por conceitos emitidos nos artigos é de inteira responsabilidade de seus autores. É permitida a reprodução total ou parcial dos artigos, desde que mencionada a fonte.

Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia



Presidente

Etelvino de Souza Trindade (DF)

Diretora Administrativa

Vera Lúcia Mota da Fonseca (RJ)

Diretor Financeiro

Francisco Eduardo Prota (SP)

Diretor Científico

Nilson Roberto de Melo (SP)

Diretor de Defesa Profissional

Hélcio Bertolozzi Soares (PR)

Vice-presidente da região Norte

Júlio Eduardo Gomes Pereira (AC)

Vice-presidente da região Nordeste

Olimpio Barbosa Moraes Filho (PE)

Vice-presidente da região Centro-Oeste

Paulo Roberto Dutra Leão (MT)

Vice-presidente da região Sudeste

Agnaldo Lopes da Silva Filho (MG)

Vice-presidente da região Sul

Jorge Abi Saab Neto (SC)

Assessora Especial de Diretoria

Hitomi Miura Nakagava (DF)

Presidência e Secretaria Executiva

Avenida das Américas, 8445 – sala 711
Barra da Tijuca – Rio de Janeiro – RJ – CEP: 22793-081
Tel.: (21) 2487-6336 – Fax: (21) 2429-5133
www.febrasgo.org.br
presidencia@febrasgo.org.br
publicacoes@febrasgo.org.br

RBGO é uma revista mensal com entrega automática para os sócios da **FEBRASGO**. Remessa com devolução garantida em caso de erro postal.

Assinaturas para pessoas jurídicas pelo fax (21) 2429-5133

TIRAGEM: 700 exemplares

Os pedidos de separatas devem ser feitos pelo telefone: 0800 77 23023. As separatas reproduzirão fielmente o texto publicado, não podendo ser feitos acréscimos ou exclusões no mesmo.

Produção Editorial



ZEPPELINI EDITORIAL

Rua Bela Cintra, 178
Cerqueira César – São Paulo – SP – 01415-000
PABX: (11) 2978-6686
www.zepelini.com.br
zepelini@zepelini.com.br

Editorial

335 Como o ginecologista pode orientar mulheres com antecedentes familiares de câncer?

VICTOR EVANGELISTA DE FARIA FERRAZ
NATHALIA MORENO CURY

How the gynecologist can guide women with a family history of cancer?

Artigos Originais

340 Loss of PTEN expression and AKT activation in HER2-positive breast carcinomas

FRANCINI DE MATTOS LIMA LIN
CARLOS EDUARDO BACCHI
EDMUND CHADA BARACAT
FILOMENA MARINO CARVALHO

Perda da expressão do PTEN e ativação da AKT em carcinomas mamários HER2-positivos

347 Acurácia dos exames citológicos cervicovaginais em Estado de elevada incidência de câncer de colo de útero

ALEX JARDIM DA FONSECA
RAISA SARON WANDERLEY MURARI
IANE SANTANA MORAES
ROBLEDO FONSECA ROCHA
LUIZ CARLOS DE LIMA FERREIRA

Validity of cervicovaginal cytology in a Brazilian State with high incidence rate of cervical cancer

353 Infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*: fatores associados à infertilidade em mulheres atendidas em um serviço público de reprodução humana

LILIAM BORGES FERNANDES
JALSI TACON ARRUDA
MÁRIO SILVA APPROBATO
MARCO TULIO ANTONIO GARCÍA-ZAPATA

Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infection: factors associated with infertility in women treated at a human reproduction public service

359 Effects of hyperprolactinemia and ovariectomy on the tibial epiphyseal growth plate and bone formation in mice

ROBERTA BASTOS WOLFF

Efeitos da hiperprolactinemia e ooforectomia sobre o disco epifisário da tíbia e formação óssea em camundongos fêmeas

367 Câncer cervical e de mama em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico

THELMA LAROCCA SKARE
BRUNO VINÍCIUS DA ROCHA

Breast and cervical cancer in patients with systemic lupus erythematosus

372 Comparação entre a concentração sérica de alfa-tocoferol de puérperas assistidas em maternidades públicas e privadas no Nordeste do Brasil

CRISTIANE SANTOS SÂNZIO GURGEL
LARISSA QUEIROZ DE LIRA
GABRIELLE MAHARA AZEVEDO
PRISCILA NUNES COSTA
JANAINA OLIVEIRA ARAÚJO
ROBERTO DIMENSTEIN

Comparison between the serum concentration of alpha-tocopherol in puerperal women assisted in public and private maternities in Northeastern Brazil

Case Report

377 Spontaneous rupture of renal angiomyolipoma during pregnancy

Rotura espontânea de um angiomiolipoma durante a gravidez

MARIANA MOURAZ LOPES DOS SANTOS
SARA MARQUES SOARES PROENÇA
MARIA INÉS NUNES PEREIRA DE ALMEIDA REIS
RUI MIGUEL ALMEIDA LOPES VIANA
LUÍSA MARIA BERNARDO MARTINS
JOÃO MANUEL DOS REIS COLAÇO
FILOMENA MARIA PINHEIRO NUNES

Resumo de Tese

381 Expressão proteica do gene HOXA10 e dos receptores de estrogênio e progesterona no epitélio, estroma e tecido muscular liso perilesional de endometriose do reto-sigmoide

HOXA10 as well as estrogen and progesterone receptor protein expression in the epithelium, stroma, and adjacent smooth muscle of rectosigmoid endometriosis

AUTOR: ALYSSON ZANATTA
ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO CÉSAR SERAFINI

Agenda

382 Agenda

Instruções aos Autores

A Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (Rev Bras Ginecol Obstet., ISSN 0100 7203), publicação mensal de divulgação científica da Federação das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia (Febrasgo), é dirigida a obstetras, ginecologistas e profissionais de áreas afins, com o propósito de publicar contribuições originais sobre temas relevantes no campo da Ginecologia, Obstetrícia e áreas correlatas. É aberta a contribuições nacionais e internacionais. A revista aceita e publica trabalhos em português, inglês e espanhol.

O material enviado para análise não pode ter sido submetido simultaneamente à publicação em outras revistas nem publicado anteriormente. Na seleção dos manuscritos para publicação, são avaliadas originalidade, relevância do tema e qualidade da metodologia utilizada, além da adequação às normas editoriais adotadas pela revista. O material publicado passa a ser propriedade da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia e da Febrasgo, só podendo ser reproduzido, total ou parcialmente, com a anuência dessas entidades.

Os manuscritos submetidos à revista são analisados por pareceristas e o sigilo sobre a autoria e a identidade dos revisores é garantido durante todo o processo de edição. Os pareceres dos revisores e as instruções do editor serão enviados para os autores para que eles tomem conhecimento das alterações a serem introduzidas. Os autores devem reenviar o texto com as modificações solicitadas assim que possível, devendo justificar, na carta de encaminhamento, se for o caso, o motivo do não atendimento de alguma sugestão para modificação. Não havendo retorno do trabalho após três meses, presume-se que os autores não têm mais interesse na publicação. Os autores podem solicitar em qualquer ponto do processo de análise e edição do texto a sustação do processo e a retirada do trabalho. Os conceitos e as declarações contidos nos artigos são de responsabilidade dos autores.

A revista publica contribuições nas seguintes categorias:

1. Artigos Originais, trabalhos completos prospectivos, experimentais ou retrospectivos. Manuscritos contendo resultados de pesquisa clínica ou experimental original têm prioridade para publicação.
2. Relatos de Casos, de grande interesse e bem documentados, do ponto de vista clínico e laboratorial. Os autores deverão indicar na carta de encaminhamento os aspectos novos ou inesperados em relação aos casos já publicados. O texto das seções Introdução e Discussão deve ser baseado em revisão bibliográfica atualizada. O número de referências pode ser igual ao dos trabalhos completos.
3. Técnicas e Equipamentos, para apresentação de inovações em diagnóstico, técnicas cirúrgicas e tratamentos, desde que não sejam, clara ou veladamente, propaganda de drogas ou outros produtos. Valem para essa categoria todas as normas aplicadas para trabalhos completos.
4. Artigos de Revisão, incluindo avaliação crítica e sistematizada da literatura, meta-análises ou revisões sistemáticas. A seleção dos temas e o convite aos autores têm como base planejamento estabelecido pela editoria. Contribuições espontâneas podem ser aceitas. Nesse caso, devem ser enviados inicialmente um resumo ou roteiro do texto, a lista de autores e as respectivas publicações sobre o tema. Se houver interesse da revista,

será enviado convite para apresentação do texto definitivo. Todos os autores devem ter publicações em periódicos regulares, indexados sobre o tema da revisão. O número de autores é limitado a quatro, dependendo do tipo de texto e da metodologia empregada. Devem ser descritos os métodos e procedimentos adotados para a obtenção do texto, que deve ter como base referências recentes, inclusive do ano em curso. Tratando-se de tema ainda sujeito a controvérsias, a revisão deve discutir as tendências e as linhas de investigação em curso. Apresentar, além do texto da revisão, resumo, abstract e conclusões. Ver a seção "Preparo do manuscrito" para informações quanto ao texto principal, página de rosto, resumo e abstract;

5. Comentários Editoriais, solicitados pelo editor;
6. Resumos de Teses apresentadas e aprovadas nos últimos 12 meses, contados da data de envio do resumo. Devem conter, aproximadamente, 300 palavras e, para serem aceitos, devem seguir as normas da revista quanto à estruturação, à forma e ao conteúdo. Incluir título em português e inglês e, no mínimo, três palavras ou expressões-chave. Não há revisão do texto dos Resumos de Teses. No arquivo enviado, informar: nome completo do autor e do orientador; membros da banca; data de apresentação e a identificação do serviço ou departamento onde a tese foi desenvolvida e apresentada. Lembramos que a publicação do resumo não impede a posterior publicação do trabalho completo em qualquer periódico.
7. Cartas dos Leitores para o Editor, versando sobre matéria editorial ou não, mas com apresentação de informações relevantes ao leitor. As cartas podem ser resumidas pela editoria, mas com manutenção dos pontos principais. No caso de críticas a trabalhos publicados, a carta é enviada aos autores para que sua resposta possa ser publicada simultaneamente.

Informações gerais

1. A revista não aceita material editorial com objetivos comerciais.
2. Conflito de interesses: devem ser mencionadas as situações que podem influenciar de forma inadequada o desenvolvimento ou as conclusões do trabalho. Entre essas situações, menciona-se a participação societária nas empresas produtoras das drogas ou dos equipamentos citados ou utilizados no trabalho, assim como em concorrentes da mesma. São também consideradas fontes de conflito os auxílios recebidos, as relações de subordinação no trabalho, as consultorias etc.
3. No texto, deve ser mencionada a submissão e a aprovação do estudo por um Comitê de Ética em Pesquisa reconhecido pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).
4. Artigo que trate de pesquisa clínica com seres humanos deve incluir a declaração, na seção Métodos, de que os sujeitos do estudo assinaram o termo de consentimento livre e informado. Os autores

devem informar, também, que a pesquisa foi conduzida de acordo com a Declaração de Helsinque revisada em 2008.

- No caso de trabalhos envolvendo experimentação animal, os autores devem indicar na seção Métodos que foram seguidas as normas contidas no CIOMS (Council for International Organization of Medical Sciences) Ethical Code for Animal Experimentation (WHO Chronicle 1985; 39(2):51-6) e os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA (www.cobea.org.br).
- Todos os ensaios controlados aleatórios (randomized controlled trials) e clínicos (clinical trials) submetidos à publicação devem ter o registro em uma base de dados de ensaios clínicos. Essa é uma orientação da Plataforma Internacional para Registros de Ensaios Clínicos (ICTRP) da Organização Mundial da Saúde (OMS), e do International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). As instruções para o registro estão disponíveis no endereço eletrônico do ICMJE (http://www.icmje.org/clin_trialup.htm) e o registro pode ser feito na base de dados de ensaios clínicos da National Library of Medicine, disponível em <http://clinicaltrials.gov/ct/gui>.
- O número de autores de trabalhos completos e relatos de casos é limitado a sete. Trabalhos de autoria coletiva (institucionais) devem ter os responsáveis especificados. Trabalhos e estudos multicêntricos podem ter número de autores compatível com o número de centros (cada situação será avaliada pela editoria e pelos revisores). Os investigadores responsáveis pelos protocolos aplicados devem ser especificados. Todos os autores devem ter conhecimento do texto enviado para a revista.
- O conceito de coautoria é baseado na contribuição de cada um, para a concepção e planejamento do trabalho, análise e interpretação dos dados, para a redação ou revisão crítica do texto. A inclusão de nomes cuja contribuição não se enquadre nos critérios citados ou que tenham fornecido apenas suporte material não é justificável.
- Os autores serão informados, por correspondência eletrônica, do recebimento dos trabalhos. Os trabalhos que estiverem de acordo com as Instruções aos Autores e se enquadram na política editorial da revista serão enviados para análise por revisores indicados pelo editor. Os originais em desacordo com os objetivos da revista ou com essas instruções são devolvidos aos autores para as adaptações necessárias antes da avaliação pelo Conselho Editorial ou recusados sem análise por revisores.
- Junto dos arquivos originais, deve ser enviada uma carta de encaminhamento, na qual deve ficar explícita a concordância com as normas editoriais, com o processo de revisão e com a transferência de copyright para a revista.
- Para manuscritos originais, não ultrapassar 25 páginas de texto digitado ou aproximadamente 30.000 caracteres. Limitar o número de tabelas e figuras ao necessário para apresentação dos resultados que são discutidos (como norma geral, limitar a cinco). Para manuscritos do tipo Relato de Caso, não ultrapassar 15 páginas de texto ou 18.000 caracteres (ver "Preparo do manuscrito", "Resultados").
- O trabalho deve ser enviado pelo sistema de submissão online no portal SciELO. O endereço eletrônico de todos os autores deve ser fornecido. Desta forma, os coautores receberão informação sobre a submissão do

trabalho e, assim, não será necessária a assinatura de todos na carta de encaminhamento. O endereço eletrônico para correspondência com a revista é rbgo@fmrp.usp.br. O arquivo correspondente ao trabalho deve ser único e deve conter texto, referências, tabelas e figuras.

Preparo dos manuscritos

As normas que seguem foram baseadas no formato proposto pelo ICMJE e publicado no artigo "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals", atualizado em Outubro de 2008 e disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org/>.

Apresentação do texto

- Os trabalhos devem ser digitados em espaço 2 em todas as seções, da página de rosto às referências bibliográficas, tabelas e legendas. Cada página deve conter aproximadamente 25 linhas em uma coluna. Usar preferencialmente o processador de texto Microsoft Word® e a fonte Times New Roman 12. Não dar destaque a trechos do texto: não sublinhar ou usar negrito. Numerar todas as páginas, iniciando pela de rosto.
- Não usar maiúsculas nos nomes próprios (a não ser a primeira letra) no texto ou nas referências bibliográficas. Não utilizar pontos nas siglas (DPP em vez de D.P.P.). Quando usar siglas ou abreviaturas, descrevê-las por extenso na primeira vez que mencionadas no texto. Iniciar cada seção em uma nova página: página de rosto; resumo e palavras ou expressões-chave; abstract e keywords; texto; agradecimentos; referências; tabelas individuais e legendas das figuras.

Página de rosto

Apresentar o título do trabalho em português e em inglês; nomes completos dos autores sem abreviaturas; endereços eletrônicos válidos de todos os autores (opcional, em substituição à carta de encaminhamento); nome da instituição onde o trabalho foi desenvolvido; afiliação institucional dos autores; informações sobre auxílios recebidos sob forma de bolsas de estudos, financiamento, fornecimento de drogas, reagentes ou equipamentos. Obrigatoriamente deve ser fornecido o endereço da instituição onde o trabalho foi desenvolvido, o qual é publicado na página inicial do trabalho. Devem ser indicados nome, endereço, telefone/fax e e-mail do autor para o qual a correspondência deve ser enviada. Essas informações pessoais são empregadas apenas para correspondência com a revista e somente são publicadas se houver pedido do(s) autor(es).

Resumo

O resumo do trabalho deve aparecer na segunda página. Para trabalhos completos, redigir um resumo estruturado, que deve ser dividido em seções identificadas: objetivo, métodos, resultados e conclusões. Deve ter aproximadamente 300 palavras. O resumo deve conter as informações relevantes, permitindo que o leitor tenha uma ideia geral do trabalho. Deve incluir descrição resumida de todos os métodos empregados e da análise estatística efetuada. Expor os resultados numéricos mais relevantes, e não apenas indicação de significância estatística. As conclusões devem ser baseadas nos resultados do trabalho e não da literatura. Evitar o uso de abreviações e símbolos. Não citar referências bibliográficas no resumo.

Abaixo do texto do resumo indicar o número de registro e/ou identificação para os ensaios controlados aleatórios e ensaios clínicos (ver item 5 das "Informações Gerais").

Na mesma página do resumo, citar pelo menos três palavras ou expressões-chave que serão empregadas para compor o índice anual da revista. Devem ser baseadas nos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) publicado pela Bireme, que é uma tradução do Medical Subject Headings (MeSH) da National Library of Medicine e está disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br>.

O abstract deve ser versão fiel do texto do resumo estruturado (purpose, methods, results e conclusions). Deve ser também acompanhado da versão para o inglês das palavras ou expressões-chave (keywords). O resumo e o abstract dos Relatos de Casos e dos Artigos de Revisão e de Atualização não devem ser estruturados e são limitados a 150 palavras.

Introdução

Repetir, na primeira página da introdução, o título completo em português e inglês. Nessa seção, mostre a situação atual dos conhecimentos sobre o tópico em estudo, divergências e lacunas que possam eventualmente justificar o desenvolvimento do trabalho, mas sem revisão extensa da literatura. Para Relatos de Casos, apresentar um resumo dos casos já publicados, epidemiologia da condição relatada e uma justificativa para a apresentação como caso isolado. Expor claramente os objetivos do trabalho.

Métodos

Iniciar essa seção indicando o planejamento do trabalho: se prospectivo ou retrospectivo; ensaio clínico ou experimental; se a distribuição dos casos foi aleatória ou não etc. Descrever os critérios para seleção das pacientes ou Grupo Experimental, inclusive dos Controles. Identificar os equipamentos e reagentes empregados (fabricante, cidade e país). Se a metodologia aplicada já tiver sido empregada, indicar as referências, além da descrição resumida do método. Descrever também os métodos estatísticos empregados e as comparações para as quais cada teste foi empregado.

Os trabalhos que apresentam como objetivo a avaliação da eficácia ou a tolerabilidade de tratamentos ou drogas devem, necessariamente, incluir Grupo Controle adequado. Para informações adicionais sobre o desenho de trabalhos desse tipo, consultar ICH Harmonized Tripartite Guideline - Choice of Control Group and Related Issues in Clinical Trials (http://www.hc-sc.gc.ca/hpfb-dgpsa/tpd-dpt/e10_e.html). Ver também itens 4 e 5 das "Informações Gerais".

Resultados

Apresentar os resultados em sequência lógica, no texto, nas tabelas e nas figuras. Expor os resultados relevantes para o objetivo do trabalho e que são discutidos. Não repetir no texto dessa seção todos os dados das tabelas e figuras, mas descrever e enfatizar os mais importantes, sem interpretação dos mesmos (ver também "Tabelas"). Nos Relatos de Casos, as seções "Métodos" e "Resultados" são substituídas pela "Descrição do caso", mantendo-se as demais.

Discussão

Devem ser realçadas as informações novas e originais obtidas na investigação. Não repetir dados e informações já mencionados nas seções "Introdução" e "Resultados". Evitar citação de tabelas e figuras. Ressaltar a adequação dos métodos empregados na investigação. Comparar e relacionar suas observações com as de outros autores, comentando e explicando as diferenças. Explicar as implicações dos achados, suas limitações e fazer as recomendações decorrentes. Para Relatos de Casos, basear a

discussão em ampla e atualizada revisão da literatura. As informações sobre os casos já publicados podem ser tabuladas e exibidas nessa seção para comparações.

Agradecimentos

Dirigidos a pessoas que tenham colaborado intelectualmente, mas cuja contribuição não justifica coautoria, ou para aquelas que tenham provido apoio material.

Referências

Todos os autores e trabalhos citados no texto devem constar dessa seção e vice-versa. Numerar as referências bibliográficas por ordem de entrada no trabalho e usar esses números para as citações no texto. Evitar número excessivo de referências, selecionando as mais relevantes para cada afirmação e dando preferência para os trabalhos mais recentes. Não empregar citações de difícil acesso, como resumos de trabalhos apresentados em congressos, teses ou publicações de circulação restrita (não indexados). Não empregar referências do tipo "observações não publicadas" e "comunicação pessoal". Artigos aceitos para publicação podem ser citados acompanhados da expressão: "aceito e aguardando publicação" ou "in press", indicando-se periódico, volume e ano. Trabalhos aceitos por periódicos que estejam disponíveis online, mas sem indicação de fascículos e páginas, devem ser citados como "ahead of print".

Outras publicações dos autores (autocitação) devem ser empregadas apenas se houver necessidade clara e forem relacionadas ao tema. Nesse caso, incluir entre as referências bibliográficas apenas trabalhos originais publicados em periódicos regulares (não citar capítulos ou revisões).

O número de referências bibliográficas deve ser aproximadamente 35. Os autores são responsáveis pela exatidão dos dados constantes das referências bibliográficas.

Para todas as referências, citar os autores até o sexto. Se houver mais de seis autores, citar os seis primeiros, seguidos da expressão et al., conforme os seguintes modelos:

- Formato impresso*
- Artigos em revistas
 - Ceccarelli F, Barberi S, Pontesilli A, Zancla S, Ranieri E. Ovarian carcinoma presenting with axillary lymph node metastasis: a case report. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2011;32(2):237-9.
 - Jiang Y, Brassard P, Severini A, Goleski V, Santos M, Leamon A, et al. Type-specific prevalence of Human Papillomavirus infection among women in the Northwest Territories, Canada. *J Infect Public Health.* 2011;4(5-6):219-27.
 - Artigos com título em inglês e texto em português ou outra língua Utilizar o título em inglês, entre colchetes e no final da referência, indicar a língua na qual o artigo foi publicado.
 - Prado DS, Santos DL. [Contraception in users of the public and private sectors of health]. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2011;33(7):143-9. Portuguese.
 - Taketani Y, Mizuno M. [Application of anti-progesterone agents for contraception]. *Rinsho Fujinka Sanka.* 1988;42(11):997-1000. Japanese.
 - Livro
 - Baggish MS, Karram MM. Atlas of pelvic anatomy and gynecologic surgery. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 2006.

- Capítulos de livro
 - Picciano MF. Pregnancy and lactation. In: Ziegler EE, Filer IJ, editors. Present knowledge in nutrition. Washington (DC): ILSI Press; 1996. p. 384-95.

Formato eletrônico

Apenas para informações estatísticas oficiais e citação de referências de periódicos não impressos. Para estatísticas oficiais, indicar a entidade responsável, o endereço eletrônico, o nome do arquivo ou entrada. Incluir o número de tela, data e hora do acesso. Termos como "serial", "periódico", "homepage" e "monography", por exemplo, não são mais utilizados. Todos os documentos devem ser indicados apenas como [Internet]. Para documentos eletrônicos com o identificador DOI (Digital Object Identifier), este deve ser mencionado no final da referência, além das informações que seguem:

- Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS [Internet]. Informações de Saúde. Estatísticas vitais. Mortalidade e nascidos vivos: nascidos vivos desde 1994. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2008. [citado 2007 Fev 7]. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinasc/cnv/nvuf.def>>
- Monografia na Internet ou livro eletrônico
 - Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>

Tabelas

Apresentar as tabelas em páginas separadas, com espaço duplo e preferencialmente fonte Arial 8. A numeração deve ser sequencial, em algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. Todas as tabelas devem ter título e todas as colunas da tabela devem ser identificadas com um cabeçalho. A legenda deve conter informações que permitam ao leitor entender o conteúdo das tabelas e figuras, mesmo sem a leitura do texto do trabalho. As linhas horizontais devem ser simples e limitadas a duas no topo e uma no final da tabela. Não empregar linhas verticais. Não usar funções de criação de tabelas, comandos de justificação, tabulações decimais ou centralizadas. Utilizar comandos de tabulação (tab) e não o espaçador para separar as colunas e, para nova linha, a tecla enter. No rodapé da tabela, deve constar legenda para abreviaturas e testes estatísticos utilizados.

Figuras (gráficos, fotografias e ilustrações)

As figuras devem ser apresentadas em páginas separadas e numeradas sequencialmente, em algarismos arábicos, conforme a ordem de aparecimento no texto. Todas as figuras devem ter qualidade gráfica adequada e apresentar título e legenda. Para evitar problemas que comprometam o padrão da revista, o processo de digitalização de imagens (scan) deve obedecer aos seguintes parâmetros: para gráficos ou esquemas, usar 300 dpi/bitmap para traço; para ilustrações e fotos (preto e branco), usar 300 dpi/RGB ou grayscale. Em todos os casos, os arquivos devem ter extensão .tif e/ou .jpg. Também são aceitos arquivos com extensão .xls (Excel), .eps, .psd para ilustrações em curva (gráficos, desenhos e esquemas). São aceitas, no máximo, cinco figuras. Se as figuras já tiverem sido publicadas, devem vir acompanhadas de autorização por escrito do autor/editor e constando a fonte na legenda da ilustração.

Legendas

Digitar as legendas usando espaço duplo, acompanhando as respectivas figuras (gráficos, fotografias e ilustrações). Cada legenda deve ser numerada em algarismos arábicos, correspondendo a cada figura, e na ordem em que foram citadas no trabalho.

Abreviaturas e siglas

Devem ser precedidas do nome completo quando citadas pela primeira vez no texto. Nas legendas das tabelas e figuras, devem ser acompanhadas de seu nome por extenso. As abreviaturas e as siglas não devem ser usadas no título dos artigos e nem no resumo.

Empregar o seguinte endereço para correspondências não previstas nas instruções:

Jurandyr Moreira de Andrade
 Editor
 Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia – Editoria – Avenida Bandeirantes, 3.900, 8º andar – Campus Universitário – CEP 14049-900 – Ribeirão Preto (SP) – Fone: (16) 3602-2803 – Fax: (16) 3633-0946 – E-mail: rbgo@fmrp.usp.br

Itens para a conferência para a submissão do manuscrito

Antes de enviar o manuscrito, conferir se as Instruções aos Autores foram seguidas e verificar o atendimento dos itens listados a seguir:

1. carta de encaminhamento assinada por todos os autores (escaneada e anexada como documento suplementar ou enviada pelo correio) ou informação dos endereços eletrônicos válidos de todos os autores na página de rosto;
2. citação da aprovação do projeto do trabalho por Comissão de Ética em Pesquisa, assinatura do termo de consentimento livre e informado (na seção "Métodos") e informação sobre o atendimento das exigências para pesquisa em animais;
3. número ou código do registro do estudo, se necessário, na página de rosto (item 5 das "Informações Gerais");
4. conflito de interesses: informar se há ou não. Se houver, explicar sem omissão de informações relevantes;
5. página de rosto com todas as informações solicitadas;
6. resumo e abstract estruturados e compatíveis com o texto do trabalho;
7. três ou mais palavras-chave relacionadas ao texto e respectivas keywords baseadas no Decs;
8. verificar se todas as tabelas e figuras estão corretamente citadas no texto e numeradas, e se as legendas permitem o entendimento das mesmas;
9. referências bibliográficas: numeradas na ordem de aparecimento e corretamente digitadas. Verificar se todos os trabalhos citados estão na lista de referências e se todos os listados estão citados no texto.

Como o ginecologista pode orientar mulheres com antecedentes familiares de câncer?

How the gynecologist can guide women with a family history of cancer?

Editorial

Introdução

Os cânceres ginecológicos representam uma parcela considerável da morbidade e mortalidade por neoplasia. Segundo o INCA, cânceres como o câncer de mama acometerão, em 2014, 57.120 mulheres, o câncer de ovário, 5.680 mulheres e o câncer de endométrio, 5.900 mulheres. Em conjunto, representam quase 25% dos tumores em mulheres, excluindo tumores de pele não melanomas¹. Cerca de 5 a 10% desses tumores podem ser hereditários.

Em que situações a história familiar de uma mulher em seguimento regular ginecológico levanta a suspeita de uma síndrome de câncer hereditário, que deveria suscitar uma investigação especializada? A maior parte dos casos seguidos em ambulatórios de aconselhamento genético de câncer no país são de pacientes com história pessoal de câncer, com ou sem história familiar. O acesso de pessoas sem câncer, mas sob risco de desenvolvê-lo por serem de famílias com síndromes de câncer hereditário, é um dos desafios a serem vencidos para uma prevenção mais eficiente nos casos hereditários.

A importância da detecção dos casos de tumores hereditários se dá em função da possibilidade de recorrência na família, disponibilidade de estratégias específicas de seguimento e prevenção e, em algumas situações, abordagens terapêuticas eficientes. O grande desafio é a detecção, dentre todos os casos de câncer, dos que caracterizariam síndromes de câncer hereditário, necessitando de atenção diferenciada em relação aos casos esporádicos.

Entre as ferramentas mais importantes disponíveis para identificação de mulheres ou familiares com risco de serem acometidos por síndromes de predisposição a câncer estão a história pessoal e familiar de câncer. Algumas informações podem sugerir que a paciente com história pessoal de câncer possa ter uma síndrome de predisposição hereditária a câncer (Quadro 1)², com ou sem história familiar associada. Especificamente para mama, ovário e endométrio algumas dessas características devem ser cuidadosamente investigadas. A idade de aparecimento do primeiro tumor, por exemplo, deve ser considerada relevante se ocorrer antes dos 50 anos para câncer de mama e endométrio, mas é indiferente para indicação de

Correspondência

Victor Evangelista de Faria Ferraz
Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo
Avenida Bandeirantes, 3.900 – Monte Alegre
CEP: 14049-900
Ribeirão Preto (SP), Brasil

Recebido

11/03/2014

Aceito com modificações

01/08/2014

DOI: 10.1590/S0100-720320140005104

¹Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

²Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

Conflito de interesses: não há.

Quadro 1. Dados relevantes para suspeita de síndromes de câncer hereditário levando em consideração a história pessoal de câncer

Dados da história pessoal
Tumores primários múltiplos (no mesmo órgão ou em órgãos diferentes)
Tumores bilaterais em órgãos pares
Tumores multifocais
Diagnóstico de câncer em idade mais precoce do que a esperada para o tumor
Tipo histológico raro
Tumor em indivíduo de sexo normalmente não afetado
Tumor associado com defeitos congênitos
Tumor associado com lesões precursoras herdadas
Tumores associados a lesões cutâneas reconhecidas como relacionadas às síndromes

Fonte: adaptado de Lindor et al.²

investigação em câncer epitelial de ovário. Outra peça de investigação importante é a possibilidade de investigação imuno-histoquímica nos tumores. Para câncer de mama, por exemplo, a imuno-histoquímica mostrando ausência de receptores de estrógeno, progesterona e HER2/neu é indicação suficiente para investigação de mutações em BRCA1 e BRCA2 em qualquer idade. Para os cânceres de endométrio, atualmente, preconiza-se a investigação por imuno-histoquímica das proteínas associadas ao sistema de reparo de malpareamento, cujo comprometimento pode estar associado à síndrome de Lynch^{3,4}. A história familiar de câncer é um importante auxiliar para investigação das síndromes de predisposição ao câncer, associada à história pessoal (Quadro 2)². Recentemente, foram publicadas recomendações específicas para a abordagem da história de câncer na família pelos oncologistas, que certamente podem ser estendidas a outras especialidades (Quadro 3)⁵. São recomendações que permitem uma seleção mais apurada dos casos que eventualmente devem ser encaminhados para investigação especializada, seguimento específico e aconselhamento genético.

Sucintamente, sem o objetivo de abranger todas as síndromes hereditárias que envolvem mama, ovário e endométrio, destacam-se aqui algumas das neoplasias mais relevantes e o papel da história familiar: a síndrome de câncer de mama e ovário hereditários, síndrome de Li-Fraumeni, síndrome de Cowden e a síndrome de Lynch. O Quadro 4 mostra os cânceres do escopo deste texto associados a cada uma delas.

Síndrome de câncer de mama e ovário hereditários (mama e ovário)

Cerca de 5–10% dos tumores de mama são hereditários⁶, e a síndrome mais prevalente que pode cursar com câncer de mama é a síndrome de câncer de mama e ovário hereditários (HBOC), respondendo por cerca de 60 a 80% dos casos. A síndrome é causada por mutações patogênicas nos genes BRCA1 e BRCA2 que, quando presentes, conferem um risco cumulativo de 80–85%

Quadro 2. Dados relevantes para suspeita de síndromes de câncer hereditário levando em consideração a história familiar de câncer

Dados da história familiar
Dois ou mais familiares de primeiro grau com tumores da mesma localização ou tumores relacionados
Dois ou mais familiares de primeiro grau com tumores raros
Dois familiares em duas gerações com tumores da mesma localização ou tumores relacionados
Evidência de transmissão autossômica dominante
Constelação de tumores característicos de uma síndrome específica

Fonte: adaptado de Lindor et al.²

Quadro 3. Elementos necessários para uma história familiar de câncer minimamente adequada

Importante na história familiar
Avaliação de parentes de 1º grau: pais, filhos e irmãos
Avaliação de parentes de 2º grau: tios e tias, avós, netos e netas, sobrinhos e sobrinhas, meio-irmão e meio-irmã
Avaliar sempre tanto o lado paterno como o materno
Indicar a etnia
Idade de diagnóstico de cada caso
Tipo do câncer primário de cada caso
Resultados de eventuais testes moleculares realizados

Quadro 4. Síndromes de câncer hereditário mais comuns associadas tipicamente aos carcinomas de mama, ovário e endométrio

Síndrome	Genes envolvidos	Câncer de mama	Câncer de ovário	Câncer de endométrio
Síndrome de câncer de mama e ovário hereditários	BRCA1 e BRCA2	+	+	-
Síndrome de Cowden	PTEN	+	-	+
Síndrome de Li-Fraumeni	TP53	+	-	-
Síndrome de Lynch	MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2/ EPCAM	-	+	+

de desenvolver câncer de mama durante toda vida e até 50% de risco para o câncer de ovário.

Segundo o *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN)³, há indicação para o teste genético relacionado a HBOC quando o indivíduo preenche os seguintes critérios:

1. indivíduos de família com histórico de mutação nos genes BRCA1 e/ou BRCA2;
2. história pessoal de câncer de mama + 1 ou mais características a seguir:
 - idade do diagnóstico ≤ 45 anos;
 - idade do diagnóstico ≤ 50 anos e/ou ≥ 1 parente próximo (1º, 2º e 3º graus) com câncer de mama em qualquer idade e/ou uma história familiar limitada ou desconhecida;
 - idade do diagnóstico ≤ 60 anos, com câncer de mama triplo negativo;
 - diagnóstico em qualquer idade, com ≥ 1 parente próximo com câncer de mama ≤ 50 anos e/ou ≥ 2

parentes próximos (1º, 2º e 3º graus) com câncer de mama em qualquer idade e/ou ≥ 1 parente próximo (1º, 2º e 3º graus) com câncer epitelial de ovário e/ou ≥ 2 parentes próximos (1º, 2º e 3º graus) com câncer pancreático ou câncer de próstata (Gleason ≥ 7) em qualquer idade e/ou um parente próximo (1º, 2º e 3º graus) do sexo masculino com câncer de mama e/ou um indivíduo de etnias de alto risco (exemplo: Judeus Ashkenazi).

3. história pessoal de câncer epitelial de ovário;
4. história pessoal de câncer de mama em homens;
5. história pessoal de câncer pancreático ou câncer de próstata (Gleason ≥ 7) em qualquer idade, com ≥ 2 parentes próximos (1º, 2º e 3º graus) com câncer de mama e/ou câncer de ovário e/ou câncer pancreático e/ou câncer de próstata (Gleason ≥ 7) em qualquer idade;
 - indivíduo com história pessoal de câncer pancreático em qualquer idade e ancestralidade Judeus Ashkenazi, com ≥ 1 parente próximo (1º, 2º e 3º graus) com câncer de mama e/ou ovário e/ou câncer pancreático e/ou câncer de próstata (Gleason ≥ 7) em qualquer idade.
6. indivíduos apenas com história familiar (a interpretação dos resultados do teste genético de indivíduos sem história pessoal de câncer deve ser discutida):
 - algum parente próximo (1º e 2º graus) da família preenchendo um dos critérios anteriores;
 - parente em 3º grau com câncer de mama e/ou câncer de ovário, com ≥ 2 parentes próximos (1º, 2º e 3º graus) com câncer de mama (no mínimo um com diagnóstico ≤ 50 anos) e/ou câncer de ovário.

Quanto ao câncer de ovário, Ledermann et al.⁷ publicaram recomendações adotadas pela *European Society of Medical Oncology*, reforçando o papel da história familiar na investigação causal. Referem que, apesar de apenas cerca de 10% dos tumores estarem ligados a mutações de BRCA1 e BRCA2, alterações nesses genes conferem risco de desenvolvimento de câncer de ovário em 15 a 45% ao longo da vida.

O *American College of Obstetricians and Gynecologists*⁸ recomenda que mulheres com mutações em BRCA1/2 ou com história familiar suspeita devam ser encaminhadas para aconselhamento genético formal para avaliar melhor o risco de câncer, incluindo o risco de câncer de ovário. A triagem com dosagens séricas de CA 125 e ultrassonografia transvaginal a cada 6 meses tem sido recomendadas para mulheres de alto risco pela *National Comprehensive Cancer Network*³. O *American College of Obstetricians and Gynecologists*⁸ também recomenda que a salpingooforectomia de redução de risco, que inclui a remoção dos ovários e das trompas de Falópio, na sua totalidade, deva

ser oferecida para mulheres com mais de 40 anos com mutações BRCA1 ou BRCA2.

Síndrome de Li-Fraumeni (mama)

A síndrome de Li-Fraumeni (SLF) é uma síndrome hereditária de predisposição ao câncer, de alta penetrância, na qual portadores de mutações patogênicas no gene TP53 apresentam um risco cumulativo de até 90% para o desenvolvimento de um amplo espectro de cânceres diagnosticados geralmente antes dos 45 anos. Os tipos de cânceres mais frequentes incluem sarcoma, câncer de mama, tumores cerebrais e carcinomas adrenocorticais. Entretanto, outros cânceres também são observados em uma menor frequência, tais como linfomas, câncer gástrico e melanoma⁹⁻¹¹. Famílias que não apresentam o fenótipo clássico da síndrome são denominadas Li-Fraumeni like (LFL) ou Li-Fraumeni variante^{12,13}.

Segundo o *National Comprehensive Cancer Network*³, há indicação para o teste genético relacionado a SLF quando o indivíduo preenche os seguintes critérios:

1. indivíduos de uma família com uma mutação conhecida no gene TP53;
2. critério da SLF clássica:
 - combinação de um indivíduo com sarcoma diagnosticado com <45 anos de idade e um parente de primeiro grau com câncer diagnosticado com <45 anos de idade e um parente de primeiro ou segundo grau com câncer diagnosticado com <45 anos ou com sarcoma em qualquer idade.
3. critérios Chompret:
 - indivíduo com tumor do *spectrum* da SLF (exemplos: sarcoma, osteosarcoma, tumor cerebral, câncer de mama, carcinoma adrenocortical, leucemia e câncer de pulmão bronquioalveolar) diagnosticado antes dos 36 anos de idade e no mínimo um parente de primeiro ou segundo grau com qualquer um dos cânceres mencionados (outro que não câncer de mama, se o probando tiver câncer de mama) diagnosticados antes dos 56 anos ou com múltiplos cânceres primários em qualquer idade;
 - indivíduo com tumores primários múltiplos (exceto múltiplos tumores de mama), sendo 2 deles pertencentes ao espectro da SLF, diagnosticado antes dos 46 anos de idade;
 - indivíduo com carcinoma adrenocortical ou carcinoma *plexus choroid* em qualquer idade, independentemente da história familiar;
4. câncer de mama precoce: indivíduo com câncer de mama diagnosticado com <35 anos de idade pode fazer o pedido do teste genético do gene TP53 simultaneamente ao dos genes BRCA1 e BRCA2 ou após um teste genético negativo para BRCA1/BRCA2.

Especialmente no sul do Brasil, a mutação *TP53* R337H, localizada no éxon 10 do gene *TP53*, tem sido associada ao aumento do risco de desenvolvimento do câncer de mama em mulheres¹⁴⁻¹⁶. Essa mutação é responsável pela troca de uma arginina por uma histidina (CGC para CAC) no códon 337 e foi primeiramente associada com tumores adrenocorticais em crianças¹⁷.

Achatz et al. realizaram um *screening* da mutação *TP53* p.R337H em 45 indivíduos de famílias não relacionadas com histórico de câncer sugestivo para SLF. Seis desses casos (13%) eram portadores da mutação, sendo que o tipo de tumor mais comum nessas famílias era o câncer de mama (30,4%)¹⁴.

A patogenicidade da mutação R337H é questionável devido ao baixo número de estudos funcionais realizados até o momento. Entretanto, como a mutação *TP53* p.R337H apresenta uma alta frequência em mulheres brasileiras com câncer de mama^{14-16,18}, o teste genético para essa mutação deveria ser realizado em todas as pacientes brasileiras com câncer de mama, independentemente da idade do diagnóstico, com história familiar contendo o espectro de tumores da SLF/LFL.

Síndrome de Cowden (mama, endométrio)

A síndrome de Cowden (CS) é uma genodermatose autossômica dominante associada a mutações no gene *PTEN* em cerca de 80% dos casos. Caracteriza-se pela presença de lesões mucocutâneas consideradas patognomônicas (triquilemomas, papilomatose mucocutânea, ceratose acral) e presentes em mais de 90% dos casos até a 3ª década de vida, associadas a macrocefalia e a presença de tumores de mama, tireoide e endométrio, considerados critérios maiores. São considerados critérios menores para o diagnóstico outras lesões de tireoide, deficiência intelectual, hamartomas de trato digestivo, lipomas, doença fibrocística da mama, fibroides uterinos, fibromas e tumores ou anomalias genitourinários. A suspeita se dá pela presença de um achado patognomônico, dois ou mais critérios maiores, um critério maior associado a três menores, ou quatro critérios menores. História familiar, associada a um achado patognomônico ou um critério maior, ou ainda dois critérios menores são suficientes para iniciar-se a investigação¹⁹. O risco de desenvolvimento de câncer de mama, em geral carcinoma ductal invasivo, em pacientes com síndrome de Cowden é de cerca de 50% durante a vida. O risco para desenvolvimento de câncer de endométrio é de cerca de 13 a 19%¹⁹.

Síndrome de Lynch (endométrio, ovário)

Entre 2 e 5% dos cânceres de endométrio podem ser ligados a mutações germinativas de genes relacionados ao sistema de reparo de malpareamento, caracterizando uma síndrome de câncer hereditário conhecida por Síndrome

de Lynch. A síndrome de Lynch envolve a predisposição autossômica dominante a câncer colorretal, câncer de endométrio e outros. Está ligada a mutações nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*, pertencentes ao sistema de reparo de malpareamento de DNA, genes cuja expressão pode ser verificada por imuno-histoquímica no tumor. Em alguns casos, está ligado a deleções germinativas no gene *EPCAM*, que indiretamente silenciam o gene *MSH2*²⁰. Uma forma mais genérica de verificar se o sistema de reparo em questão está afetado é através do exame de instabilidade de micros-satélites por PCR no tumor, que não aponta especificamente qual proteína está alterada ou ausente^{2,21}.

Mulheres com síndrome de Lynch têm risco de 30 a 70% de apresentar câncer de endométrio durante a vida. Há dúvidas sobre a estratégia mais custo-eficaz para detecção desses casos, havendo propostas de avaliação do sistema de reparo de malpareamento no tumor, por imuno-histoquímica ou instabilidade de micros-satélites nos tumores de pacientes com menos de 50 anos, com menos de 60 anos de idade em determinadas condições ligadas a características histopatológicas, ou mesmo universalmente²². Mesmo assim, fica claro que, para mulheres com carcinoma de endométrio em idade inferior a 50 anos, essa avaliação deveria ser rotineira.

Diagnóstico, seguimento e tratamento

A *National Comprehensive Cancer Network*³ mantém atualizados protocolos consensuais para os casos de investigação de casos de alto risco, assim como o seguimento de casos de pacientes com síndromes de câncer hereditário, ou sob suspeita, que envolvem cânceres de mama, ovário e endométrio. Esses protocolos podem ser acessados em http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#detection e permitem uma orientação mais específica, voltada para a suspeita diagnóstica.

Aconselhamento genético

O aconselhamento genético para pacientes e familiares com ou sob risco de síndromes de câncer hereditário é essencial para a abordagem adequada a essa problemática. O sequenciamento dos genes das síndromes suspeitadas deve sempre ser acompanhado de aconselhamento pré e pós-teste, explicações sobre as possibilidades e limitações dos exames a serem realizados, as possibilidades de prevenção e a apresentação da estratégia de seguimento³.

A melhoria da qualidade da obtenção da história familiar de câncer em mulheres em seguimento ginecológico regular é uma necessidade para uma detecção mais precoce dos casos que merecem uma estratégia de prevenção diferenciada. Certamente, um desafio que os ginecologistas podem enfrentar com facilidade.

Referências

1. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2014.
2. Lindor NM, McMaster ML, Lindor CJ, Greene MH; National Cancer Institute, Division of Cancer Prevention, Community Oncology and Prevention Trials Research Group. Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes-second edition. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2008;(38):1-93.
3. National Comprehensive Cancer Network [Internet]. Genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian: V.1.2014. Fort Washington: NCCN; 2014 [cited 2014 Jul 12]. (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology). Available from: <http://demystifyingmedicine.od.nih.gov/DM10/0413-BreastCancer/NCCN%20br%20genetics_screening.pdf>
4. Egoavil C, Alenda C, Castillejo A, Paya A, Peiro G, Sánchez-Heras AB, et al. Prevalence of Lynch syndrome among patients with newly diagnosed endometrial cancers. *PLoS One.* 2013;8(11):e79737.
5. American Society of Clinical Oncology [Internet]. ASCO issues new recommendations for family history taking in oncology setting. Alexandria: ASCO; 2014 [cited 2014 Feb 20]. Available from: <<http://www.asco.org/advocacy/asco-issues-new-recommendations-family-history-taking-oncology-setting>>
6. Chacón RD, Costanzo MV. Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12 Suppl 2:S3.
7. Ledermann JA, Raja FA, Fotopoulou C, Gonzalez-Martin A, Colombo N, Sessa C, et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2013;24 Suppl 6:vi24-32.
8. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Gynecologic Practice. Committee Opinion No. 477: the role of the obstetrician-gynecologist in the early detection of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol.* 2011;117(3):742-6.
9. Li FP, Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med.* 1969;71(4):747-52.
10. Nichols KE, Malkin D, Garber JE, Fraumeni JF Jr, Li FP. Germline p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(2):83-7.
11. Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, Prosser J, Condie A, Kelsey AM, et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res.* 1994;54(5):1298-304.
12. Eeles RA. Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv.* 1995;25:101-24.
13. Chompret A, Brugières L, Ronsin M, Gardes M, Dessarps-Freichay F, Abel A, et al. P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. *Br J Cancer.* 2000;82(12):1932-7.
14. Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, Martel-Planche G, Lopes A, Rossi BM, et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett.* 2007;245(1-2):96-102.
15. Assumpção JG, Seidinger AL, Mastellaro MJ, Ribeiro RC, Zambetti GP, Ganti R, et al. Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. *BMC Cancer.* 2008;8:357.
16. Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, Olivier M, Martel-Planche G, Le Calvez-Kelm F, et al. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. *Hum Mutat.* 2010;31(2):143-50.
17. Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, Pereira RM, Cheng C, Liu W, et al. Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. *J Med Genet.* 2006;43(1):91-6.
18. Cury NM, Ferraz VE, Silva WA Jr. TP53 p.R337H prevalence in a series of Brazilian hereditary breast cancer families. *Hered Cancer Clin Pract.* 2014;12(1):8.
19. Blumenthal GM, Dennis PA. PTEN hamartoma tumor syndromes. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(11):1289-300.
20. Kempers MJ, Kuiper RP, Ockeloen CW, Chappuis PO, Hutter P, Rahner N, et al. Risk of colorectal and endometrial cancers in EPCAM deletion-positive Lynch syndrome: a cohort study. *Lancet Oncol.* 2011;12(1):49-55.
21. Goodenberger M, Lindor NM. Lynch syndrome and MYH-associated polyposis: review and testing strategy. *J Clin Gastroenterol.* 2011;45(6):488-500.
22. Moline J, Mahdi H, Yang B, Biscotti C, Roma AA, Heald B, et al. Implementation of tumor testing for Lynch syndrome in endometrial cancers at a large academic medical center. *Gynecol Oncol.* 2013;130(1):121-6.

Loss of PTEN expression and AKT activation in HER2-positive breast carcinomas

Perda da expressão do PTEN e ativação da AKT em carcinomas mamários HER2-positivos

Original Article

Keywords

Genes, erbB-2
Breast neoplasms
Immunohistochemistry
PTEN phosphohydrolase
Oncogene protein v-akt

Palavras-chave

Genes, erbB-2
Neoplasias da mama
Imuno-histoquímica
PTEN fosfo-hidrolase
Proteína oncogênica v-akt

Abstract

PURPOSE: To examine the expression of AKT and PTEN in a series of HER2-positive primary invasive breast tumors using immunohistochemistry, and to associate these expression profiles with classic pathologic features such as tumor grade, hormone receptor expression, lymphatic vascular invasion, and proliferation. **METHODS:** A total of 104 HER2-positive breast carcinoma specimens were prepared in tissue microarrays blocks for immunohistochemical detection of PTEN and phosphorylated AKT (pAKT). Original histologic sections were reviewed to assess pathological features, including HER2 status and Ki-67 index values. The associations between categorical and numeric variables were identified using Pearson's chi-square test and the Mann-Whitney, respectively. **RESULTS:** Co-expression of pAKT and PTEN was present in 59 (56.7%) cases. Reduced levels of PTEN expression were detected in 20 (19.2%) cases, and these 20 tumors had a lower Ki-67 index value. In contrast, tumors positive for pAKT expression [71 (68.3%)] were associated with a higher Ki-67 index value. **CONCLUSION:** A role for AKT in the proliferation of HER2-positive breast cancers was confirmed. However, immunohistochemical detection of PTEN expression did not correlate with an inhibition of cellular proliferation or control of AKT phosphorylation, suggesting other pathways in these mechanisms of control.

Resumo

OBJETIVOS: Avaliar a expressão imuno-histoquímica de AKT e PTEN em uma série de carcinomas mamários invasivos HER2-positivos, e associar seus padrões de expressão com variáveis anatomopatológicas clássicas, como grau histológico, expressão de receptores hormonais, embolização vascular linfática e atividade proliferativa. **MÉTODOS:** Um total de 104 amostras de carcinomas mamários invasivos HER2-positivos foram preparadas em blocos de microarranjos de tecido para detecção imuno-histoquímica de PTEN e AKT fosforilada (pAKT). Cortes histológicos originais foram revistos para avaliação das características anatomopatológicas, incluindo o estado do HER2 e a avaliação da expressão de Ki-67. As associações entre as variáveis categóricas e as numéricas foram feitas com o uso dos testes do chi-quadrado de Pearson e Mann-Whitney, respectivamente. **RESULTADOS:** Co-expressão de pAKT e PTEN foi identificada em 59 (56,7%) casos. Expressão reduzida de PTEN foi detectada em 20 (19,2%) casos, e esses 20 tumores mostraram menores valores de Ki-67. Por outro lado, tumores positivos para pAKT [71 (68,3%)] apresentaram células positivas para valores mais altos de Ki-67. **CONCLUSÕES:** O papel de AKT na proliferação de carcinomas mamários HER-2 positiva foi confirmada. Entretanto, a detecção imuno-histoquímica de PTEN não se correlacionou com inibição da proliferação celular ou controle da fosforilação de AKT, sugerindo outras vias nesses mecanismos de controle.

Correspondence

Filomena Marino Carvalho
Department of Pathology, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo
Avenida Doutor Arnaldo, 455 – room 1149
Zip code: 01246-903
São Paulo (SP), Brazil

Received

05/26/2014

Accepted with modifications

07/04/2014

DOI: 10.1509/S0100-720320140005034

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brazil.

¹ Department of Obstetrics and Gynecology Postgraduation Program, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brazil.

² Patology Consultancy – Botucatu (SP), Brazil.

³ Department of Obstetrics and Gynecology, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brazil.

⁴ Department of Pathology, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brazil.

Conflict of interests: none.

Introduction

Breast cancer is a heterogeneous disease including distinct entities according to clinical behavior, pathological features, and molecular subtypes. Prognosis is largely dependent on intrinsic molecular subtype based on gene expression: luminal A, luminal B, HER2 overexpressing, and basal-like¹. Approximately 20–25% of breast cancer cases involve overexpression of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)², a transmembrane receptor with tyrosine kinase activity that regulates several cellular processes such as cell proliferation, differentiation, adhesion, survival, and migration³. One of the most potent signaling pathways promoted by HER2 over expression is the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT signaling cascade which affects cell cycle progression and can inhibit apoptosis³. The PI3K enzyme is a heterodimer composed of a regulatory subunit (p85) and a catalytic subunit (p110). Upon activation by tyrosine kinase receptors, PI3K phosphorylates phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) to produce phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3)⁴. PIP3 then recruits the serine/threonine kinase, AKT, to the plasma membrane. Upon phosphorylation of Ser473 of AKT, several kinases are activated, including the mammalian target of rapamycin (mTOR), an important molecule that regulates cell growth, p21 and p27, as well as several other molecules that inhibit apoptosis, such as Bad and caspase proteins^{5–7}. It has been reported that activated AKT can be an indicator of poor prognosis, possibly by promoting cell survival⁸. To regulate AKT activity, PI3K is opposed by PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), which converts PIP3 back to PIP2, thus preventing phosphorylation and activation of AKT. As a result, cellular proliferation is inhibited and tumor formation is suppressed⁹.

PTEN is a tumor-suppressor gene that is located on chromosome 10q23.3¹⁰. Mutations in the PTEN gene, some of which lead to loss of PTEN protein expression, are related to a variety of human cancers, including prostatic and endometrial carcinomas. Among breast cancers, lack of PTEN protein expression is mainly attributed to loss of heterozygosity or promoter methylation of the PTEN gene^{10,11}. In addition, activation of the PI3K pathway, as a result of low levels, or the absence, of PTEN expression, has been associated with resistance to trastuzumab, a recombinant humanized monoclonal antibody that recognizes the extracellular domain of HER2^{12–14}. Therefore, reduced PTEN expression in breast carcinomas may reflect a more aggressive biologic behavior¹⁵. Correspondingly, several studies have demonstrated that deregulation of the PI3K/AKT/PTEN pathway is associated with poor prognosis, an increased incidence of disease recurrence, and a shorter disease-free survival period^{15–18}. In this study,

immunoexpression of pAKT and PTEN were assayed in a series of HER2-positive primary invasive breast tumor specimens. These expression profiles were then compared with clinicopathologic features of the tumors, including proliferative activity determined by expression of Ki-67.

Methods

Selection of the samples

This project was approved by the Scientific Committee of the Department of Obstetrics and Gynecology, and the Department of Pathology, of the Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo (Brazil), and also by the Ethical Committee for Research Projects of the Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Brazil (CAPPesq) (protocol 0756/08).

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens from 104 consecutive patients with HER2-positive primary breast carcinomas diagnosed in 2007 and 2008 were selected from the files of the Consultoria em Patologia (Botucatu, São Paulo), a major reference laboratory in Brazil that receives approximately 6,000 breast specimens per year. Inclusion criteria were: the availability of adequate tissue material, lack of any previous treatment, and HER2 positivity according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology (ASCO) and the college of American Pathologists (CAP)¹⁹. The mean age of the patients included in this study was 54.0±12.4 years old (range 30–91).

Pathological examination and tissue microarray construction

Two observers (F.M.L.L. and F.M.C) reviewed all slides, and the histologic type was determined based on the World Health Organization classification criteria²⁰. Ninety-six (92.3%) tumors were classified as ductal, 3 (2.9%) as mucinous, 2 (1.9%) as micropapillary, 2 (1.9%) as signet ring cell, and 1 (0.9%) as pleomorphic invasive lobular carcinoma. Other histologic features evaluated included grade according to the Nottingham criteria²¹, nuclear grade, presence of necrosis (absent or present), and peritumoral vascular invasion. Histologic and nuclear grades 1 and 2 were combined for statistical purposes, since we had only one case histologic and nuclear grade. Immunohistochemical detection of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), Ki67, and HER2 were performed using original whole histologic sections. All of the immunohistochemistry assays were performed in the same laboratory, using the same protocol, by the same pathologist.

A representative area of each tumor was selected for the construction of tissue microarray (TMA) blocks and for immunohistochemical studies of PTEN and pAKT. Areas of interest for each tumor were identified

in tissue sections stained with hematoxylin/eosin, and these sections were marked in the corresponding paraffin donor blocks. One cylinder of material (2.0 mm in diameter) was punched from each case and was mounted into recipient paraffin blocks at 2 mm intervals using a precision microarray instrument (Beecher Instruments, Silver Spring, MD). A grid system was established such that each core had an x- and y-coordinate reference for sample identification. Blocks were sealed at 60°C for 10 minutes. Sections (3 µm) from each TMA block were then prepared using standard techniques and mounted on Starfrost® slides. The first histological sections cut were stained with hematoxylin-eosin to ensure that the appropriate sections of the tumor had been obtained.

Immunohistochemistry and scoring

The antigens employed were ER (clone SP1, Dako, Carpinteria, USA, dilution 1:1000); PR (clone PgR 636, Dako, Carpinteria, USA, dilution 1:600); HER2 (clone

SP3, Neomarkers, Fremont, USA, dilution 1:300); Ki-67 (clone MIB1, Dako, Carpinteria, USA, dilution 1:4800); pAKT (clone LP18, Novocastra, Richmond, USA, dilution 1:200), and PTEN (clone 28H6, Novocastra, Richmond, USA, dilution 1:800). Pressure cooker was the epitope retrieval method for all markers, except for PTEN, for which microwave oven was used. The bound antibodies were detected by goat anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase-labelled polymerized secondary antibodies (DAKO EnVision™ System). Peroxidase activity was visualized with diaminobenzidine (Dako).

HER2 expression was confirmed on TMA slides and the samples were considered positive if they received a 3+ score according to guidelines from ASCO and CAP¹⁹ (Figure 1A).

Tumors were considered positive for ER and PR expression if at least 10% of the cells were stained, according to the criteria of Park et al.²². Ki-67 index values were expressed as the percentage of positive cells present among at least 500 tumor cells in hot spot areas. The highest

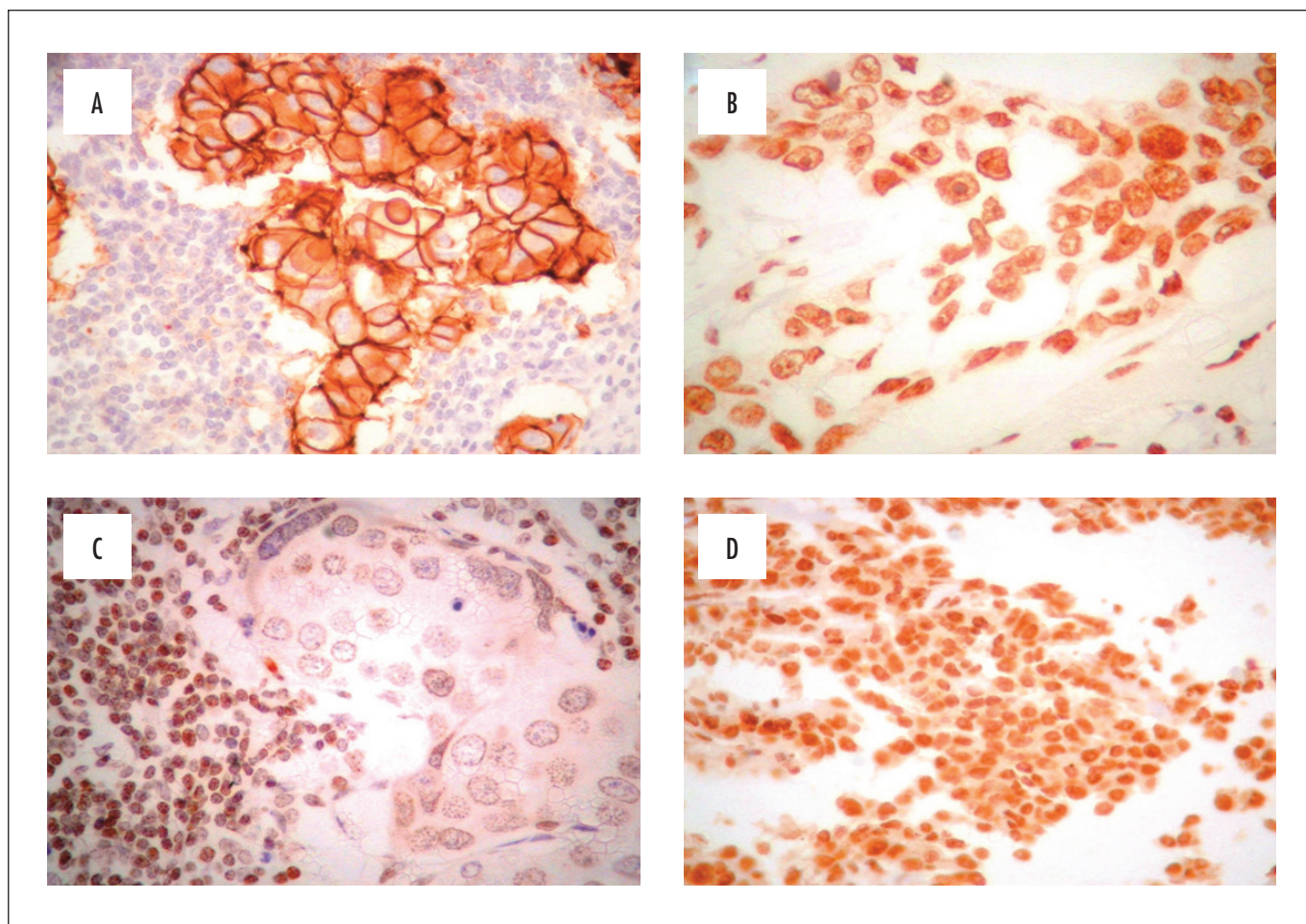


Figure 1. (A) HER2 positive carcinoma with complete and strong membrane expression of the protein in more than 30% of cells; (B) PTEN present characterized by nuclear expression in 100% of neoplastic cells; (C) PTEN reduced characterized by negative reaction contrasting with positive lymphocyte; (D) AKT diffusely positive in the neoplastic cells

value obtained in TMA sections or whole sections was the reported score. Tumors were classified according to the expression of PTEN. "PTEN present" indicated tumors with diffuse and strong positivity in 100% of the nuclei (Figure 1B), while "PTEN reduced" indicated tumors with less than 100% of nuclear positivity (Figure 1C).

The pAKT expression was assessed based on the percentage of nuclear and/or cytoplasmic positive cells in a sample. Tumors with at least 10% of the stained cells positive for pAKT expression were classified as positive according to the criteria of Gori et al.²³ (Figure 1D).

Statistical analysis

Associations between categorical variables were identified using Pearson's chi-square test, while the Mann-Whitney test was used to compare groups according to numeric variables (e.g., patient age, Ki-67 index values).

A p-value less than 0.05 was considered significant. Statistical analysis were performed using MedCalc for Windows (version 11.5.0.0; MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

Table 1. Clinicopathological features of the HER2-positive breast carcinomas examined according to PTEN expression

Features	PTEN reduced n (%)	PTEN present n (%)	p-value
Cases	20 (19.2)	84 (80.8)	
Age (years)	49±10.0	53±13.1	0.26 ^a
Histologic grade			
½	9 (45)	37 (44)	0.99 ^b
3	10 (50)	47 (55)	
Nuclear grade			
½	4 (20)	20 (23)	0.96 ^b
3	15 (75)	64 (76)	
Peritumoral vascular invasion			
Yes	6 (30)	26 (30)	0.84 ^b
No	11 (55)	49 (58)	
Tumor necrosis			
Yes	5 (25.0)	30 (35.7)	0.54 ^b
No	14 (70.0)	51 (60.7)	
ER			
Positive	8 (40)	42 (50)	0.58 ^b
Negative	12 (60)	42 (50)	
PR			
Positive	6 (30)	28 (84)	0.98 ^b
Negative	14 (70)	56 (66)	
Ki-67			
Interval	15–90	0–90	0.03 ^a
Mean ± SD	35.5±19.7	46±22.7	
Median	37.5	40	

^aMann-Whitney test; ^bPearson's chi-square test; ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor.

Results

Associations between PTEN expression and clinicopathologic features of the cohort studied are listed in Table 1. The only statistically significant difference between PTEN-reduced and PTEN-present tumors was the proliferative activity detected with Ki-67 staining. Furthermore, samples with diffuse expression of PTEN exhibited higher levels of proliferation.

Expression of pAKT was found to be associated with a low histological grade (p=0.03). In addition, an association between expression of pAKT, a lower tumor necrosis, and an ER-positive status were observed. However, these associations were not statistically significant. None of the other clinicopathological features studied were associated with pAKT expression (Table 2). The Ki-67 index values were higher for tumors expressing pAKT compared with tumors that did not express pAKT (45.6±22.1 versus

Table 2. Clinicopathological features of the HER2-positive breast carcinomas examined according to pAKT expression

Features	pAKT positive n (%)	pAKT negative n (%)	p-value
Cases	71 (68.3)	33 (31.7)	
Age (years)	53.2±13.2	54.9±11.9	0.62 ^a
Histologic grade			
½	37 (52.8)	9 (27.2)	0.03 ^b
3	33 (47.1)	24 (72.7)	
Not assessed	1	0	
Nuclear grade			
½	18 (25.7)	6 (18.1)	0.55 ^b
3	52 (74.2)	27 (81.8)	
Not assessed	1	0	
Lymphatic vascular invasion			
Yes	20 (31.7)	12 (41.3)	0.50 ^b
No	43 (68.2)	17 (58.6)	
Not assessed	8	4	
Tumor necrosis			
Yes	20 (28.5)	15 (50.0)	0.07 ^b
No	50 (71.4)	15 (50.0)	
Not assessed	1	3	
ER			
Positive	39 (54.9)	11 (33.3)	0.06 ^b
Negative	32 (45.0)	22 (66.6)	
PR			
Positive	27 (38.0)	7 (21.2)	0.14 ^b
Negative	44 (61.9)	26 (78.7)	
Ki-67			
Interval	0–95	15–80	0.22 ^a
Mean ± SD	45.6±22.1	40.4±21.5	
Median	40	30	

^aMann-Whitney test; ^bPearson's chi-square test; ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor.

40.4±21.5), although the difference was not statistically significant. Moreover, diffuse PTEN expression was observed in 59/71 (83.1%) of tumors positive for pAKT, and in 25/33 (75.7%) of tumors negative for pAKT, although the difference was not significant ($p=0.06$; chi-square=0.4).

Discussion

In this study, expression of PTEN and pAKT was assayed in 104 HER2-positive primary breast tumors. Since these molecules have previously been shown to mediate antagonistic mechanisms, their associations with clinicopathological features were examined.

Cowden's disease is a hereditary cancer predisposition syndrome that is associated with an elevated risk of breast and thyroid cancer. Germ line mutations in PTEN have been identified in patients with Cowden's disease, and the frequency of sporadic breast cancer with loss of PTEN expression has been reported to range from 30-40%^{4,18,24-26}. In the present study, the frequency of breast cancer with loss of PTEN expression was 19.2%. However, loss of PTEN expression was evaluated using immunohistochemistry, and this method may underestimate the proportion of invasive breast tumors that contain an inactivated version of PTEN. For example, in a retrospective study conducted by Bose et al.¹⁸, loss of PTEN expression in a set of 34 sporadic invasive breast tumors was also evaluated using immunohistochemistry. The molecular status of these tumors had previously been established, including the PTEN genotype. For 13 cases with loss of heterozygosity (LOH) at the 10q23 locus, only 6 exhibited lower levels of PTEN expression in immunohistochemistry assays. The remaining seven cases exhibited no loss of PTEN expression. These data suggest that immunohistochemistry assays may not have sufficient sensitivity to detect the decrease in PTEN levels associated with LOH, and this is consistent with the findings of the present study.

Except for proliferative activity, none of the clinicopathological parameters examined was found to be associated with the PTEN results obtained. While similar results have been reported in other studies^{11,16,27}, significant associations between certain clinicopathological characteristics and PTEN loss have also been reported. For example, Lee et al.¹⁵ found that reduced PTEN expression is correlated with lymph node status, tumor grade, and TNM stage. However, there was no significant difference between PTEN expression and patient age, tumor size, or invasion of the lymphovascular space¹⁵. Bose et al.¹⁸ also demonstrated that reduced expression of PTEN was associated with a high tumor grade. On the other hand, though, Pérez-Tenorio et al.⁴ demonstrated that loss of PTEN was associated with an ER positive status ($p=0.001$), small tumor size ($p=0.02$) and low levels of HER2 expression

($p=0.01$), characteristics that have been associated with a less aggressive phenotype and low proliferative activity. The results of Pérez-Tenorio et al.⁴ with the proliferative activity were similar to ours. In addition, it cannot be ruled out that methodological factors and/or the number of cases examined may be responsible for these discrepancies.

Surprisingly, Ki-67 index values were found to be higher for tumors with strong, diffuse expression of PTEN compared to PTEN reduced tumors, or tumors negative for PTEN expression. We hypothesize that high PTEN expression represents a positive feedback signal for proliferative activity, which has previously been described for the endometrium. Immunohistochemistry was used to evaluate the expression of PTEN in samples of normal endometrium obtained during different phases of the menstrual cycle. In their study, Mutter et al.²⁸ demonstrated that endometrial expression of PTEN varies during the proliferative and secretory phases, with levels of PTEN being higher during the first one. This finding was unexpected at the time, and the explanation proposed was that a functional requirement for PTEN-mediated tumor suppressor activity was specific for a highly mitotic, estrogenic environment, while progestin-dominated conditions would inhibit cell division and PTEN activity would be reduced. Although breast tissue and endometrium tissue are quite different, it is possible that this mechanism may be common to both. For example, PTEN positivity in breast tumors that exhibit higher proliferative activity may involve a compensatory mechanism that aims to control cell proliferation to maintain the delicate balance of the intracellular environment.

In the series examined, the proportion of breast cancers positive for pAKT expression (71/104, 68.3%) was similar to that reported in other studies^{6,23}. The AKT has been found to mediate protumorigenic effects of hormones and growth factors, and the anchorage-mediated survival of epithelial cells. Accordingly, activation of AKT stimulates glucose metabolism, cell cycle progression, and survival through the phosphorylation of multiple substrates, including GSK3, BAX, and mTOR among others²⁹. In the present study, a significant inverse relationship between pAKT positivity and tumor histological grade was observed ($p=0.02$). Additional inverse relationships between pAKT positivity and lymphatic vascular invasion and tumoral necrosis were also observed, yet these were not statistically significant. These findings are consistent with those of other studies^{6,27}, yet are in contrast with accumulating evidence that AKT harbors anti-apoptotic properties and promotes tumor progression and tumor growth^{29,30}. In addition, other studies have demonstrated a direct relationship between pAKT and tumor histologic grade³⁰.

It was also observed that some tumors were both pAKT positive and ER positive, although this association did not reach statistical significance. Previous studies have demonstrated

that a complex network of cross-talk occurs between the HER2 activation pathway and ER mediated signaling³¹⁻³³. For example, in an *in vitro* model, Stoica et al.³⁴ demonstrated that estradiol can activate the PI3K/AKT pathway in MCF-7 breast cancer cells, and that this effect was ErbB2 dependent. While these results remain to be confirmed in other breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*, they are consistent with the positive correlation observed between expression of ER and pAKT in our study, and in other studies^{6,27}.

Regarding PR expression, Tokunaga et al.³⁵ previously showed that LOH at the PTEN locus and HER2 overexpression enhance activation of AKT. Since activated AKT has been shown to repress transcription of PR independent of ER expression, loss of PR expression can be induced even in ER-positive breast carcinomas³⁵. Accordingly, in the present study, PR expression was lower in tumors positive for pAKT expression, although this correlation was not significant.

An unexpected result was that PTEN expression tended to correlate with pAKT expression. Similarly, in a study by Bose et al.⁷ with 145 invasive breast cancers and 140 pure ductal carcinomas *in situ*, AKT and its downstream

proteins were found to be activated in approximately 30% of the cancers analyzed independent of PTEN loss. This finding suggests that other mechanisms of AKT activation exist in addition to the activation of AKT by growth factor receptors with tyrosine kinase activity.

The results of the present study confirm that AKT has an important role in cellular proliferation and is associated with low grade carcinomas. However, paradoxically, diffuse expression of PTEN protein was found to be more frequent among tumors positive for pAKT and exhibiting a higher proliferative activity. These data suggest that PTEN is not the primary control mechanism for AKT phosphorylation, and molecules associated with other signaling pathways may be involved. Therefore, while inactivation of PTEN has been described as one of the mechanisms involved in the resistance of HER2 tumors to trastuzumab therapy, it may represent a rare event. Furthermore, we hypothesize that an increase in cellular proliferation may trigger diffuse expression of PTEN in an attempt by the cell to reduce levels of PTEN expression. However, further studies will be needed to investigate this hypothesis.

References

- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
- Ravdin PM, Chamness GC. The c-erbB-2 proto-oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: a paradigm for the development of other macromolecular markers—a review. *Gene*. 1995;159(1):19-27.
- Barros FF, Powe DG, Ellis IO, Green AR. Understanding the HER family in breast cancer: interaction with ligands, dimerization and treatments. *Histopathology*. 2010;56(5):560-72.
- Pérez-Tenorio G, Alkhori L, Olsson B, Waltersson MA, Nordenskjöld B, Rutqvist LE, et al. PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(12):3577-84.
- Al-Bazz YO, Underwood JC, Brown BL, Dobson PR. Prognostic significance of Akt, phospho-Akt and BAD expression in primary breast cancer. *Eur J Cancer*. 2009;45(4):694-704.
- Aleskandarany MA, Rakha EA, Ahmed MA, Powe DG, Ellis IO, Green AR. Clinicopathologic and molecular significance of phospho-Akt expression in early invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;127(2):407-16.
- Bose S, Chandran S, Mirocha JM, Bose N. The Akt pathway in human breast cancer: a tissue-array-based analysis. *Mod Pathol*. 2006;19(2):238-45.
- Pérez-Tenorio G, Stål O; Southeast Sweden Breast Cancer Group. Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. *Br J Cancer*. 2002;86(4):540-5.
- Wang L, Zhang Q, Zhang J, Sun S, Guo H, Jia Z, et al. PI3K pathway activation results in low efficacy of both trastuzumab and lapatinib. *BMC Cancer*. 2011;11:248.
- Hollander MC, Blumenthal GM, Dennis PA. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:289-301.
- Bakaragos P, Theohari I, Nomikos A, Mylona E, Papadimitriou C, Dimopoulos AM, et al. Immunohistochemical study of PTEN and phosphorylated mTOR proteins in familial and sporadic invasive breast carcinomas. *Histopathology*. 2010;56(7):876-82.
- Dave B, Migliaccio I, Gutierrez MC, Wu MF, Chamness GC, Wong H, et al. Loss of phosphatase and tensin homolog or phosphoinositol-3 kinase activation and response to trastuzumab or lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancers. *J Clin Oncol*. 2011;29(2):166-73.
- Calabrich A, Fernandes GS, Katz A. Trastuzumab: mechanisms of resistance and therapeutic opportunities. *Oncology (Willist Park, N.Y.)*. 2008;22(11):1250-8.
- Razis E, Bobos M, Kotoula V, Eleftheraki AG, Kalofonos HP, Pavlakis K, et al. Evaluation of the association of PIK3CA mutations and PTEN loss with efficacy of trastuzumab therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;128(2):447-56.
- Lee JS, Kim HS, Kim YB, Lee MC, Park CS, Min KW. Reduced PTEN expression is associated with poor outcome and angiogenesis in invasive ductal carcinoma of the breast. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004;12(3):205-10.
- Capodanno A, Camerini A, Orlandini C, Baldini E, Resta ML, Bevilacqua G, et al. Dysregulated PI3K/Akt/PTEN pathway is a marker of a short disease-free survival in node-negative breast carcinoma. *Hum Pathol*. 2009;40(10):1408-17.

17. Saal LH, Johansson P, Holm K, Gruvberger-Saal SK, She QB, Maurer M, et al. Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(18):7564-9.
18. Bose S, Crane A, Hibshoosh H, Mansukhani M, Sandweis L, Parsons R. Reduced expression of PTEN correlates with breast cancer progression. *Hum Pathol*. 2002;33(4):405-9.
19. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3997-4013.
20. Tavassoli FA, Devilee A. Pathology and genetics: tumours of breast and female genital organs. Lion: IARC Press; 2003.
21. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-10.
22. Park S, Koo J, Park HS, Kim JH, Choi SY, Lee JH, et al. Expression of androgen receptors in primary breast cancer. *Ann Oncol*. 2010;21(3):488-92.
23. Gori S, Sidoni A, Colozza M, Ferri I, Mameli MG, Fenocchio D, et al. EGFR, pMAPK, pAkt and PTEN status by immunohistochemistry: correlation with clinical outcome in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab. *Ann Oncol*. 2009;20(4):648-54.
24. Depowski PL, Rosenthal SI, Ross JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol*. 2001;14(7):672-6.
25. Perren A, Weng LP, Boag AH, Ziebold U, Thakore K, Dahia PL, et al. Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *Am J Pathol*. 1999;155(4):1253-60.
26. Gonzalez-Angulo AM, Ferrer-Lozano J, Stemke-Hale K, Sahin A, Liu S, Barrera JA, et al. PI3K pathway mutations and PTEN levels in primary and metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(6):1093-101.
27. Panigrahi AR, Pinder SE, Chan SY, Paish EC, Robertson JF, Ellis IO. The role of PTEN and its signalling pathways, including AKT, in breast cancer; an assessment of relationships with other prognostic factors and with outcome. *J Pathol*. 2004;204(1):93-100.
28. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Eng C. Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(6):2334-8.
29. Riggio M, Polo ML, Blaustein M, Colman-Lerner A, Lüthy I, Lanari C, et al. PI3K/AKT pathway regulates phosphorylation of steroid receptors, hormone independence and tumor differentiation in breast cancer. *Carcinogenesis*. 2012;33(3):509-18.
30. Gershtein ES, Scherbakov AM, Shatskaya VA, Kushlinsky NE, Krasil'nikov MA. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signalling pathway components in human breast cancer: clinicopathological correlations. *Anticancer Res*. 2007;27(4A):1777-82.
31. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*. 1995;270(5241):1491-4.
32. Miller TW, Hennessy BT, González-Angulo AM, Fox EM, Mills GB, Chen H, et al. Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer. *J Clin Invest*. 2010;120(7):2406-13.
33. Miller TW, Balko JM, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase and antiestrogen resistance in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(33):4452-61.
34. Stoica GE, Franke TF, Wellstein A, Czubayko F, List HJ, Reiter R, et al. Estradiol rapidly activates Akt via the ErbB2 signaling pathway. *Mol Endocrinol*. 2003;17(5):818-30.
35. Tokunaga E, Oki E, Kimura Y, Yamanaka T, Egashira A, Nishida K, et al. Coexistence of the loss of heterozygosity at the PTEN locus and HER2 overexpression enhances the Akt activity thus leading to a negative progesterone receptor expression in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;101(3):249-57.

ALEX JARDIM DA FONSECA¹
RAISA SARON WANDERLEY MURARI²
IANE SANTANA MORAES³
ROBLEDO FONSECA ROCHA⁴
LUIZ CARLOS DE LIMA FERREIRA⁵

Acurácia dos exames citológicos cervicovaginais em Estado de elevada incidência de câncer de colo de útero

Validity of cervicovaginal cytology in a Brazilian State with high incidence rate of cervical cancer

Artigo Original

Palavras-chave

Citologia cervical
Neoplasias do colo do útero/diagnóstico
Neoplasias do colo do útero/epidemiologia

Keywords

Cervical cytology
Uterine cervical neoplasms/diagnosis
Uterine cervical neoplasms/epidemiology

Resumo

OBJETIVO: Avaliar a acurácia da citologia cervicovaginal realizada no principal laboratório do Estado de Roraima, por concordância entre avaliadores (monitoramento externo) e com resultados histopatológicos. **MÉTODOS:** Lâminas de 100 mulheres, de uma amostra de conveniência de base populacional, foram avaliadas pelo LAPER, principal laboratório de referência do Sistema Único de Saúde do Estado de Roraima e reavaliadas por médicos patologistas *experts* externos ao laboratório. Foram avaliados índice Kappa, sensibilidade e especificidade. O estudo foi aprovado pela Coordenação do Laboratório Estadual e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Roraima. **RESULTADOS:** Quanto à prevalência de atipias celulares (relacionadas ao papilomavírus humano), não houve concordância entre resultados emitidos pelo LAPER e pelos patologistas externos ($k=0,21$). Constatou-se baixa sensibilidade (28,5%) e especificidade de 89,2% para o desempenho do LAPER, com elevada proporção de resultados falsos positivos e falsos negativos. Os laudos citológicos de patologistas externos apresentaram sensibilidade e especificidade maiores (71,4 e 98,9%, respectivamente), descartando que erros de coleta e coloração possam explicar o baixo desempenho do LAPER. **CONCLUSÃO:** O baixo desempenho diagnóstico da citologia cervicovaginal pode ser uma barreira para o controle do câncer de colo de útero em Roraima. Ressalta-se a necessidade de capacitação profissional e monitoramento interno e externo em Estados brasileiros com alta incidência de câncer de colo de útero.

Abstract

PURPOSE: To evaluate the validity of cervicovaginal cytology performed at LAPER, the main Laboratory of Pathology of the State of Roraima, Brazil, by interrater agreement (external monitoring) and agreement with histopathologic results. **METHODS:** One hundred women were included, a population-based convenience sample. Their cervical cytological exams were evaluated by the laboratory staff and reviewed by expert medical pathologists, external to the laboratory. Cohen's Kappa index, sensitivity and specificity were evaluated. The study was approved by LAPER coordination and Federal University of Roraima Research Ethics Committee. **RESULTS:** Regarding the prevalence of human papillomavirus-related atypical, there was no concordance between the results issued by LAPER and by the external pathologists ($k=0.21$). A low sensitivity (28.5%) and specificity (89.2%) was detected for the diagnostic performance of LAPER, with a high proportion of false positive and false negative results. The cytological reports of the external pathologists showed higher sensitivity and specificity (71.4 and 98.9%, respectively), ruling out the possibility that errors related to collection methods and staining would explain the low performance of the laboratory. **CONCLUSION:** A low diagnostic accuracy of cervicovaginal cytology can be a barrier against the control of cervical cancer in Roraima. We emphasize the need for professional training and internal and external monitoring in Brazilian states with a high incidence of cervical cancer.

Correspondência

Alex Jardim da Fonseca
Avenida Pedro Teixeira, 25 – Dom Pedro
CEP: 69040-000
Manaus (AM), Brasil

Recebido

17/06/2014

Aceito com modificações

07/07/2014

DOI: 10.1590/S0100-720320140005061

Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Universidade do Estado do Amazonas – Manaus (AM); Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Roraima – Boa Vista (RO), Brasil.

¹Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Universidade do Estado do Amazonas – Manaus (AM); Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Roraima – Boa Vista (RO), Brasil.

²Hospital Geral de Roraima – Boa Vista (RO), Brasil.

³Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Roraima – Boa Vista (RO), Brasil.

⁴Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Roraima – Boa Vista (RO), Brasil.

⁵Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Universidade do Estado de Roraima – Manaus (AM), Brasil.

Conflito de interesses: não há.

Introdução

A redução na incidência e na mortalidade decorrentes do câncer de colo de útero (CCU) observada globalmente nas últimas quatro décadas não ocorreu de forma homogênea, mas principalmente em países desenvolvidos que conseguiram implementar programas preventivos sólidos de rastreamento populacional baseado em citologia cervicovaginal do colo de útero¹. Atualmente, 80% dos casos de CCU ocorrem em países em desenvolvimento econômico, como o Brasil, e correspondem a aproximadamente 15% de todos os tipos de câncer feminino².

A estratégia governamental brasileira para controle do CCU tem se concentrado no rastreamento de mulheres de 25 a 64 anos, com periodicidade de 3 anos, após 2 exames anuais consecutivos com resultado normal³. Entretanto, a persistência de elevadas taxas de incidência e mortalidade por CCU no país aponta para uma ainda insuficiente efetividade dos programas. No Brasil, onde atualmente o CCU é a principal causa de morte por câncer em mulheres jovens (até 35 anos)¹, são estimados quase 20 mil novos casos (18/100.000) em 2014⁴.

Muitos fatores podem explicar o sucesso parcial dos programas de rastreamento, como baixa cobertura populacional da estratégia preventiva, falhas no acompanhamento das mulheres com anormalidades citológicas, adoção de condutas terapêuticas inadequadas, entre outros⁵. Porém, um fator decisivo é a vulnerabilidade da técnica do Papanicolaou a erros de coleta e subjetividade da leitura das lâminas⁶. Apesar dos esforços do Ministério da Saúde para padronização da leitura das lâminas⁷, há evidências de que a sensibilidade e a especificidade da citologia cervicovaginal variam de acordo com a região analisada, podendo afetar adversamente os resultados de estratégia preventiva^{8,9}.

A região amazônica caracteriza-se por elevada incidência de CCU, sendo a única região brasileira onde o CCU é mais incidente que o câncer de mama⁴. Em especial, o Estado de Roraima destaca-se por apresentar a mais alta taxa de incidência de CCU do país. Um estudo de base populacional¹⁰ revelou elevada taxa de incidência bruta dessa doença em 2010 em Roraima (46,2/100.000), superando as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), incidência comparável à de países subdesenvolvidos de baixa renda. Entretanto, há mais de uma década, o monitoramento das ações programáticas de controle do CCU aponta elevada cobertura do teste de citologia cervicovaginal no Estado de Roraima (>85% da população-alvo)⁷. Além disso, em 2008, o IBGE divulgou o resultado da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD)¹¹ referente ao acesso e à utilização de serviços de saúde, entre outros dados. Nesse inquérito domiciliar, 72,7% das mulheres de Roraima (entre 25 e 60 anos) afirmaram

ter sido submetidas ao teste de Papanicolaou, ao passo que para a região Norte essa taxa foi de 76,9% e para o Brasil, de 78,4%. Um inquérito telefônico¹² realizado pelo Ministério da Saúde divulgou que 79,6% das mulheres de Roraima informaram ter realizado o exame nos últimos três anos, uma adesão acima da média nacional.

Considerando que a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda uma cobertura populacional de aproximadamente 80% para controlar a morbidade e a mortalidade por CCU em uma região, as evidências sugerem que falhas em outra etapa da estratégia preventiva estejam implicadas no sucesso parcial do programa preventivo em Roraima. Não existem informações sobre a acurácia do teste de citologia cervicovaginal em Roraima (Região Norte do Brasil). O objetivo deste estudo é avaliar a validade do teste preventivo do CCU realizado na rede do Sistema Único de Saúde (SUS) do Estado de Roraima.

Métodos

O estudo foi desenhado para avaliar a concordância de resultados de exames histopatológicos do colo de útero (padrão ouro) e exames de citologia cervicovaginal realizados pelo principal laboratório da rede SUS do Estado de Roraima e por avaliadores independentes (médicos patologistas externos), com uma amostra de base populacional, que faz parte de uma linha de pesquisa que investiga a magnitude da infecção por papilomavírus humano (HPV) em populações nativas do Estado de Roraima. O projeto foi previamente aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Protocolo 16.800; Parecer 325/2012). O presente estudo também foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Roraima – UFRR (Parecer 686.700/2014) e pela Coordenação do Laboratório de Patologia do Estado de Roraima (LAPER). A utilização de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi dispensada em razão da natureza secundária dos dados analisados.

A amostra deste estudo — uma amostra de conveniência — foi extraída de um estudo original de coorte, iniciado em 2013, que avalia a incidência de lesões invasivas e precursoras de CCU e de infecção por HPV pela técnica de PCR com sequenciamento genético. Foram selecionadas aleatoriamente 100 mulheres cujo exame foi positivo para DNA de HPV (qualquer genótipo). Todas haviam sido avaliadas inicialmente por citologia cervicovaginal, reavaliadas por colposcopia e submetidas à biópsia do colo de útero por cirurgia de alta frequência.

Primeiramente, as lâminas de citologia cervicovaginal foram avaliadas por médicos patologistas seniores externos ao laboratório onde foram inicialmente avaliadas (professores universitários de patologia e *experts* em citopatologia). Posteriormente, as mesmas lâminas foram entregues e reavaliadas, cegamente, no LAPER, localizado

na capital Boa Vista, atualmente responsável pelos laudos de exames de citologia do colo de útero da rede SUS do Estado de Roraima, servindo a Unidades de Saúde Básica, Centros de Referência em Saúde da Mulher e Hospitais Terciários do Estado. As amostras histológicas do colo de útero, coletadas em momento posterior ao da citologia, foram também avaliadas pelos patologistas externos (também cegamente), e os resultados de histopatologia foram analisados como padrão ouro.

No estudo original, para obtenção de amostras da ectocérvice uterina e de fundo de saco vaginal foi utilizada a Espátula de Ayres. A coleta de material representativo do canal endocervical foi realizada com o uso da escova endocervical. As amostras foram distendidas em lâminas de vidro, duplamente identificadas. O material estendido na lâmina foi imediatamente borrifado com solução fixadora (Vagispec[®], Adlin Plástico Ltda., Santa Catarina, Brasil), constituída por propilenoglicol e álcool absoluto, armazenado e transportado para o LAPER. Nesse laboratório, as lâminas foram coradas segundo técnica tradicional, conforme recomendado por diretrizes brasileiras³, que consiste de imersões das lâminas consecutivamente em álcool etílico 99,5°GL, corante hematoxilina, corante Orange, corante EA-50 e xilol.

A leitura das lâminas foi realizada segundo as diretrizes brasileiras para o rastreamento do CCU e a nomenclatura brasileira para laudos citológicos cervicovaginais¹³. Para fins da pesquisa, três aspectos dos resultados de cada exame foram analisados, a saber: (1) adequabilidade do material da lâmina; (2) alterações celulares benignas; (3) atipias celulares. Os resultados de atipias celulares foram classificados para fins de pesquisa em: (a) normal; (b) lesão intraepitelial de baixo grau (do inglês, LSIL); (c) lesão intraepitelial de alto grau (do inglês, HSIL); (d) carcinoma invasivo; (e) atipia celular escamosa de significado indeterminado (do inglês, ASC-US).

■ Análise de dados

Prevalência de atipias citológicas e/ou alterações benignas foi definida como número de exames alterados dividido pelo número de exames coletados. Para comparação entre proporções, foi utilizado o teste do χ^2 com correção de Yates. Quando não aplicável (amostras pequenas), foi utilizado o teste exato de Fischer. O nível de significância considerado foi de 5%. Foram calculadas a sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos positivos e negativos da leitura dos exames citológicos realizados no LAPER e pelos patologistas externos. Quanto à avaliação de concordância entre avaliadores, foi utilizado o método de Kappa de Cohen. Foi considerada ausência de concordância para valores de Kappa (κ) menores de 0,2; concordância sofrível entre 0,2 e 0,4; fraca entre 0,4 e 0,6; moderada entre 0,6 e 0,8; e elevada se $>0,8$. As análises estatísticas foram

realizadas utilizando o *software* EpiInfo[®] 7.0 versão para Windows (CDC, Atlanta, US).

Resultados

Os resultados citológicos emitidos pelos patologistas externos e pelo LAPER concordaram quanto à elevada prevalência de lâminas com amostras satisfatórias (98 e 100%, respectivamente, $\kappa=0,9$). Duas lâminas foram consideradas de qualidade insatisfatória pelos patologistas externos, ambas por apresentarem $>75\%$ de células inflamatórias (neutrófilo).

Quanto às alterações benignas, apesar de nenhum exame ter sido laudado como normal pelo LAPER, mais de um quarto das lâminas (27%) foi interpretado como normal pelos patologistas, e não houve concordância entre os avaliadores nesse aspecto ($\kappa=0,3$). A prevalência de resultado com inflamação foi significativamente maior segundo avaliação dos profissionais do laboratório quando comparada à dos patologistas externos (94 *versus* 67%, respectivamente; $p=0,01$; $\kappa=0,1$). A Tabela 1 compara as prevalências de resultados do LAPER, dos patologistas externos, atribui graus de concordâncias e os compara com o resultado histopatológico.

Em relação ao diagnóstico de atipias celulares, exames normais foram mais comuns quando laudados pelos patologistas externos do que pelo LAPER (91 *versus* 78%, respectivamente; $p=0,02$; $\kappa=0,3$). A prevalência de alterações atípicas (de qualquer grau) sugestivas de infecção por HPV relatada pelo laboratório foi mais que o triplo quando comparada à leitura por patologistas externos (5 *versus* 12%, respectivamente; $p=0,03$). Observou-se baixíssima ou nenhuma concordância entre avaliadores nos quesitos de atipias celulares ($\kappa=0,2$).

Ao avaliar a correlação entre os laudos citológicos emitidos pelo LAPER e os resultados histopatológicos, observou-se fraca concordância para o diagnóstico normal (ausência de atipia) ($\kappa=0,4$) e baixíssima concordância (ou nenhuma) para o diagnóstico de LSIL e HSIL ($\kappa=0,25$ e $\kappa=0,05$; respectivamente). Quando avaliada a correlação entre os laudos citológicos dos patologistas externos e os resultados histopatológicos, observou-se elevada concordância para o diagnóstico normal ($\kappa=0,8$), assim como para o diagnóstico de LSIL ($\kappa=0,8$) e de HSIL ($\kappa=1,0$).

Considerando o laudo histopatológico como padrão ouro para detecção de atipia celular sugestiva de HPV, a sensibilidade do exame citológico realizado pelo LAPER quanto à presença de lesão intraepitelial de qualquer grau (não ASCUS) foi de apenas 28,5%, e a especificidade foi de 89,2% (Tabela 2). Nesse cenário, a avaliação realizada pelos patologistas externos apresentou desempenho substancialmente melhor, sensibilidade de 71,4% e especificidade de 98,8%. O valor preditivo positivo (VPP) dos laudos emitidos pelo

Tabela 1. Correlação entre avaliadores da amostra citológica do colo de útero e o diagnóstico histopatológico (padrão ouro)

Resultado	Diagnóstico histopatológico (padrão ouro) (%)	Interpretação citologia do LAPER (%)	Índice Kappa ^a (LAPER x padrão ouro)	Interpretação citologia de patologistas externos (%)	Índice Kappa ^b (patologistas x padrão ouro)	Índice Kappa ^c (LAPER x patologistas)
Adequabilidade da amostra citológica						
Satisfatória	–	100	–	98	–	0,9
Insatisfatória	–	0	–	2	–	
Alterações citológicas benignas						
Normal	–	0	–	27	–	0,4
Presença de inflamação	–	94	–	67	–	0,1
Presença de atrofia	–	6	–	6	–	0,6
Atipias celulares						
Normal	93	78	0,5	91	0,8	0,3
ASC-US	–	10	–	3	–	0,1
LSIL	6	6	0,2	5	0,8	0,01
HSIL	1	5	0,05	1	1,0	–
Carcinoma invasor	0	1	–	0	–	–
Lesão intraepitelial de qualquer grau	7	12	0,2	5	0,8	0,2

^a Índice Kappa entre diagnóstico histopatológico e resultado citológico do LAPER; ^b Índice Kappa entre diagnóstico histopatológico e resultado citológico de patologistas externos; ^c Índice Kappa entre resultado citológico do LAPER e resultado citológico de patologistas externos; LAPER: Laboratório de Patologia do Estado de Roraima; ASC-US: atipia celular escamosa de significado indeterminado; LSIL: lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL: lesão intraepitelial de alto grau.

Tabela 2. Sensibilidade e especificidade do exame citológico por avaliadores quanto à detecção de atipias celulares sugestivas de HPV

	Histopatologia – Resultado com atipia	Histopatologia – Resultado sem atipia	
Citologia laboratório rede SUS			
Presença de atipia celular	2	10	VPP=16,6%
Exame normal	5	83	VPN=94,3%
	Sensibilidade=28,5%	Especificidade=89,2%	
Citologia patologistas externos			
Presença de atipia celular	5	1	VPP=83,3%
Exame normal	2	92	VPN=97,9%
	Sensibilidade=71,4%	Especificidade=98,9%	

SUS: Sistema Único de Saúde; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

LAPER com diagnóstico positivo para lesão intraepitelial foi de apenas 16,6%, ao passo que o valor preditivo negativo (VPN) foi 94,3%. Observou-se elevada proporção de falsos positivos (83%) nessa análise. A acurácia diagnóstica do teste realizado pelo LAPER foi de 24,9%.

Discussão

Desde a implementação pelo governo brasileiro de medidas para ampliação do acesso da população ao exame de rastreamento do CCU, os citotécnicos têm sido os profissionais de triagem na maioria dos laboratórios públicos, realizando a leitura inicial de 100% das lâminas e encaminhando os exames alterados (usualmente 10 a 30%) para verificação por médico patologista ou médicos com especialização em citopatologia¹⁴. Por ser um teste observador dependente, a acurácia diagnóstica da citologia cervicovaginal é fortemente influenciada por treinamento e capacitação dos profissionais

envolvidos na coleta e na leitura. A principal crítica ao desempenho do teste de Papanicolaou, como exame de rastreamento, reside na elevada proporção de falsos negativos, o que negligencia mulheres portadoras de lesões potencialmente preveníveis ou curáveis⁹.

Este estudo demonstrou que laudos de citologia cervicovaginal emitidos pelo principal laboratório da rede SUS do Estado de Roraima apresentaram baixa concordância em relação à reavaliação por médicos patologistas *experts*, bem como em relação ao exame histopatológico. O fato de as mesmas lâminas de citologia terem sido reavaliadas cegamente por médicos patologistas externos, e essas avaliações terem obtido desempenho satisfatório em relação à histopatologia, descarta que erros de coleta ou de coloração das lâminas possam justificar o baixo desempenho diagnóstico do LAPER. Ressalta-se que não houve concordância entre avaliadores em relação à presença de inflamação, um dos critérios mais objetivos da avaliação citológica.

A baixa sensibilidade observada para detecção de lesões pré-malignas cervicais pelo LAPER contraria os princípios de elegibilidade de um teste para triagem de câncer. Para triar uma doença grave e potencialmente curável como o câncer, é fundamental elevada sensibilidade diagnóstica, o que tende a aumentar o valor preditivo negativo, reduzindo a proporção de falsos negativos. Os resultados deste estudo sugerem que uma elevada proporção de mulheres portadoras de lesão intraepitelial cervical, rastreadas na rede SUS do Estado de Roraima para o CCU, recebem resultados citológicos falsos negativos, privando-as de acompanhamento especializado quando ainda assintomáticas e/ou com doença inicial. De fato, evidências apontam que, ainda hoje, a maioria dos casos de CCU é diagnosticada em estágio avançado no Estado de Roraima¹⁰, apesar de a meta de cobertura populacional de rastreamento ser satisfatória há mais de uma década⁷.

A elevada proporção de falsos positivos também constatada no desempenho diagnóstico do LAPER acarreta outra condição adversa em saúde pública. Pacientes saudáveis, erroneamente apontadas como portadoras de lesões pré-malignas, tendem a ser encaminhadas para Centros de Referência de Saúde da Mulher para prosseguir a investigação com exames adicionais, como colposcopia e biópsia, gerando filas de espera e gastos desnecessários e inúteis. Em situações de escassez de recurso, todos os esforços deveriam ser focados na alocação mais eficiente possível dos recursos disponíveis

na sociedade, para que possam ser direcionados para as mulheres que realmente se beneficiariam de exames e atendimento médico especializado¹⁵.

Este estudo possui limitações. Em razão de a prevalência do desfecho (citologia alterada) ter sido baixa, fica implícita menor confiabilidade dos resultados positivos em decorrência da maior probabilidade de falsos positivos. Isso não invalida o uso do valor preditivo positivo como um indicador de qualidade do exame citológico, porém este deve ser analisado de forma conservadora. Entretanto, a sensibilidade e a especificidade são propriedades exclusivas do teste e não sofrem variação com a prevalência do evento estudado.

Países e regiões que obtiveram sucesso no controle do CCU minimizaram as falhas de desempenho da citologia cervicovaginal por meio da busca constante por qualidade diagnóstica em seus laboratórios¹⁶.

A principal contribuição deste estudo foi ratificar a observação de como o teste de citologia cervicovaginal é dependente da qualificação e da categoria dos profissionais envolvidos na leitura. Ressalta-se a importância do monitoramento interno e externo de qualidade dos laudos citológicos emitidos para a avaliação do desempenho dos laboratórios integrantes do SUS em regiões de elevada incidência de CCU. Estudos demonstram que a proporção de resultados falsos negativos diminui drasticamente em laboratórios submetidos à avaliação sistemática de qualidade, sendo o monitoramento externo o mais empregado^{17,18}.

Referências

1. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre) [Internet]. Summary report on HPV and cervical cancer statistics in Brazil. 2007 [citado 2008 maio 13]. Disponível em: <http://www.hu.ufsc.br/projeto_hpv/OMS%20HPV%20BRAZIL.pdf>
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893-917.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo de útero. Rio de Janeiro: INCA; 2011.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância [Internet]. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2014 [citado 2014 jun 2]. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>>
5. Novaes HM, Braga PE, Schout D. Fatores associados à realização de exames preventivos para câncer nas mulheres brasileiras, PNAD 2003. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2006;11(4):1023-35.
6. Girianelli VR, Thuler LC, Szklo M, Donato A, Zardo LM, Lozana JA, et al. [Comparison of hybrid capture II, liquid based cytology and Pap test for the early detection of the cervical cancer in Rio de Janeiro, Brazil]. *Rev Bras Cancerol*. 2004;50(3):225-6. Portuguese.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Monitoramento das ações de controle de câncer de colo de útero e mama. *Bol Inf Detecção Precoce* [Internet]. 2011 [citado 2012 ago 8];2(3). Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/4a_prova.pdf>
8. Gontijo RC, Derchain SF, Montemor EB, Sarian LO, Serra MM, Zeferino LC, et al. Citologia oncológica, captura de híbridos II e inspeção visual no rastreamento de lesões cervicais. *Cad Saúde Pública*. 2005;21(1):141-9.
9. Pinho AA, Mattos MC. Validade da citologia cervicovaginal na detecção de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de colo de útero. *J Bras Patol Med Lab*. 2002;38(3):225-31.
10. Fonseca AJ, Ferreira LP, Dalla-Benetta AC, Roldan CN, Ferreira ML. [Epidemiology and economic impact of cervical cancer in Roraima, a Northern state of Brazil: the public health system perspective]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2010;32(8):386-92. Portuguese.
11. Brasil. Ministério do Planejamento [Internet]. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílio: PNAD 2008. Um panorama da saúde no Brasil. Acesso e utilização dos serviços, condições de saúde e fatores de risco e proteção à saúde 2008. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2008 [citado 2014 mar 17]. Disponível em: <<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/monografias/GEBIS%20-%20RJ/panorama.pdf>>

12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde [Internet]. *Vigitel Brasil 2012: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2013 [citado 2014 mar 17]. Disponível em: <http://www.sbpt.org.br/downloads/arquivos/vigitel_2012.pdf>
13. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva [Internet]. *Nomenclatura brasileira para laudos citopatológicos cervicais*. 3ª ed. Rio de Janeiro: INCA; 2012 [citado 2014 mar 17]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/nomenclatura_laudo_cervical.pdf>
14. Thuler LC, Zardo LM, Zeferino LC. Perfil dos laboratórios de citopatologia do Sistema Único de Saúde. *J Bras Patol Med Lab*. 2007;43(2):103-14.
15. Caetano R, Vianna CM, Thuler LC, Girianelli VR. [Cost-effectiveness of the early diagnosis of cervical cancer in Brazil]. *Physis*. 2006;16(1):99-118. Portuguese.
16. Crothers BA, Jones BA, Cahill LA, Moriarty AT, Mody DR, Tench WD, et al. Quality improvement opportunities in gynecologic cytologic-histologic correlations: findings from the College of American Pathologists Gynecologic Cytopathology Quality Consensus Conference working group 4. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(2):199-213.
17. Amaral RG, Santos SH, Catharino JM, Silva LC, Westin MC, Cotta AC, et al. Revisão rápida de esfregaços cervicais como método de garantia interna de qualidade. *J Bras Patol Med Lab*. 2003;39(2):151-5.
18. Tavares SB, Amaral RG, Manrique EJ, Sousa NL, Albuquerque ZB, Zeferino LC. Controle da qualidade em citopatologia cervical: revisão de literatura. *Rev Bras Cancerol*. 2007;53(3):355-64.

LILIAM BORGES FERNANDES¹

JALSI TACON ARRUDA²

MÁRIO SILVA APPROBATO²

MARCO TULIO ANTONIO GARCÍA-ZAPATA¹

Infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*: fatores associados à infertilidade em mulheres atendidas em um serviço público de reprodução humana

Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infection: factors associated with infertility in women treated at a human reproduction public service

Artigo Original

Palavras-chave

Doenças sexualmente transmissíveis
Infecções por *Chlamydia*
Gonorréia
Prevalência
Infertilidade
Técnicas reprodutivas assistidas

Keywords

Sexually transmitted diseases
Chlamydia infections
Gonorrhea
Prevalence
Infertility
Reproductive techniques, assisted

Resumo

OBJETIVO: Avaliar a prevalência de infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres submetidas à reprodução assistida em um serviço público de referência da região Centro-Oeste do Brasil. **MÉTODOS:** Estudo transversal com 340 mulheres com idade entre 20 e 47 anos, histórico de infertilidade, submetidas às técnicas de reprodução assistida. Foram analisadas as infecções por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* detectadas em amostras de urina pela técnica de PCR e o perfil da infertilidade. Utilizou-se o teste do χ^2 ou o teste exato de Fisher para avaliar a associação entre a infecção e as variáveis. **RESULTADOS:** Observou-se prevalência de 10,9% das mulheres com infecção por *Chlamydia trachomatis*, sendo que houve coinfeção por *Neisseria gonorrhoeae* em 2 casos. Mulheres infectadas por *Chlamydia trachomatis* apresentaram mais de 10 anos de infertilidade (54,1%; $p < 0,0001$). O fator tubário foi a principal causa nos casos com infecção (56,8%; $p = 0,047$). A obstrução tubária foi encontrada em 67,6% dos casos com infecção positiva ($p = 0,004$). **CONCLUSÃO:** Houve associação da obstrução tubária com a infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, reforçando a necessidade de estratégias efetivas para detecção precoce das doenças sexualmente transmissíveis, principalmente em mulheres assintomáticas em idade fértil.

Abstract

PURPOSE: To evaluate the prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in women undergoing assisted reproduction in a public reference service in the midwestern region of Brazil. **METHODS:** A cross-sectional study was conducted on 340 women aged from 20 to 47 years with a history of infertility, undergoing assisted reproduction techniques. Infections with *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* identified in urine specimens by PCR, and the profile of infertility were analyzed. We used the χ^2 test or Fisher's exact test to evaluate the association between infection and variables. **RESULTS:** The prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection was 10.9%, and *Neisseria gonorrhoeae* co-infection was observed in 2 cases. Women infected with *Chlamydia trachomatis* had more than 10 years of infertility (54.1%; $p < 0.0001$). The tubal factor was the main cause in infected cases (56.8%; $p = 0.047$). Tubal occlusion was found in 67.6% of cases with positive infection ($p = 0.004$). **CONCLUSION:** There was an association of tubal obstruction with infection by *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*, reinforcing the need for effective strategies for an early detection of sexually transmitted diseases, especially in asymptomatic women of childbearing age.

Correspondência

Liliam Borges Fernandes
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás
Rua 235, s/n – Setor Universitário
CEP: 74605-050
Caixa Postal 12.911
Goiânia (GO), Brasil

Recebido

23/04/2014

Aceito com modificações

11/07/2014

DOI: 10.1590/S0100-720320140005009

Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Reemergentes do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás – UFG – Goiânia (GO), Brasil.

¹Núcleo de Pesquisas em Agentes Emergentes e Reemergentes, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás – UFG – Goiânia (GO), Brasil.

²Laboratório de Reprodução Humana, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás – UFG – Goiânia (GO), Brasil.
Conflito de interesses: não há.

Introdução

Doenças sexualmente transmissíveis (DST) causam impactos na saúde, em especial nos países em desenvolvimento, com graves consequências para a saúde reprodutiva da mulher¹. A população sexualmente ativa apresenta cerca de 92 milhões de casos por *Chlamydia trachomatis* (CT) e 62 milhões por *Neisseria gonorrhoeae* (NG) e a maioria ocorre principalmente em jovens de países em desenvolvimento^{2,3}. Esse tipo de infecção não é de notificação compulsória no Brasil e diversos novos casos ocorrem a cada ano³.

A infecção por CT apresenta ampla prevalência, particularmente entre jovens e adolescentes sexualmente ativos, infectando homens e mulheres, mas com consequências mais graves para as mulheres. A infecção urogenital por esses agentes microbianos é problema de saúde pública, sendo considerada a maior causa de morbidade entre indivíduos sexualmente ativos, já que o indivíduo não tratado atua como reservatório para a transmissão da infecção aos parceiros sexuais^{3,4}.

O rastreamento dessas infecções tem sido meta das campanhas de saúde pública e vem sendo realizado nos serviços de saúde que atendem as mulheres, gestantes e adolescentes, ocorrendo durante atendimentos específicos como o planejamento familiar, o pré-natal e nos exames de prevenção do câncer do colo de útero⁵. A importância do diagnóstico e do tratamento adequado se dá pelo fato de que esses agentes microbianos são os principais causadores das infecções femininas⁶. Cerca de 70% das infecções por CT e metade das infecções por NG em mulheres são assintomáticos^{3,4} e pacientes com gonorreia apresentam infecção concomitante por clamídia⁷⁻¹⁰.

Mulheres com infecções genitais ascendentes desenvolvem salpingite e abscessos tubovarianos⁷. Se não tratadas adequadamente, podem evoluir para salpingite aguda com ou sem endometrite e doença inflamatória pélvica (DIP)⁹, que causa infertilidade em 20% dos casos, podendo chegar a 50% entre as mulheres que apresentam 3 ou mais episódios de infecção, além de gravidez ectópica em 9% dos casos e dor pélvica em 18%^{3,7,11}. No Brasil, os dados epidemiológicos relacionados à DIP são poucos e subestimados tanto pela subnotificação quanto pelo subdiagnóstico^{12,13}.

As taxas de prevalência das infecções por CT e NG variam amplamente segundo a população pesquisada, o sítio de onde a amostra é coletada e o teste utilizado para o diagnóstico¹⁴. Os testes diretos, como a pesquisa de antígenos e ácidos nucleicos, apresentam maior sensibilidade e especificidade para o diagnóstico, embora impliquem em maior custo. Os indiretos, como a pesquisa de anticorpos séricos, são frequentemente utilizados para o rastreamento devido à facilidade para coleta e manuseio,

mas apresentam restrições por não serem adequados para pesquisa de infecção ativa e pelos altos percentuais de reações cruzadas^{5,15}.

A escassez de estudos sobre esse tema no Brasil, particularmente com mulheres inférteis, se deve a vários fatores, principalmente à falta de sintomas clínicos, que dificulta a identificação das mulheres infectadas^{5,16}. Há dificuldade de acesso a testes laboratoriais para detecção dos patógenos por reação em cadeia da polimerase (PCR), sobretudo nos serviços de saúde públicos. Mesmo assim, não faz parte da rotina de ginecologistas ou urologistas solicitar esses exames, exceto nos serviços de reprodução humana que seguem as Resoluções da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e resoluções do Conselho Federal de Medicina^{4,17}.

A sorologia é solicitada à maioria das pacientes com queixa de infertilidade. Todavia, é possível que haja casos de sorologia positiva sem haver a presença da bactéria, embora o agente possa permanecer após infecção primária^{4,17}. A faixa etária das pacientes que procuram os serviços de reprodução assistida, mais de 30 anos, não coincide com a faixa etária de maior prevalência que se encontra nos adolescente e jovens¹⁸. Diante desse fato, é fundamental compreender se a infecção por CT e NG permanece após a adolescência, sendo, assim, passível de tratamento, ou se ficariam apenas as sequelas.

O presente estudo teve por objetivo avaliar a prevalência de infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres submetidas à reprodução assistida em um serviço público de referência da região Centro-Oeste do Brasil.

Métodos

Foi realizado um estudo observacional transversal retrospectivo, que incluiu 340 pacientes atendidas no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2012 no Laboratório de Reprodução Humana (LabRep) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas (parecer nº 196/2011).

Informações referentes a essas pacientes foram extraídas dos registros médicos disponíveis no SisFert (prontuário eletrônico de uso do LabRep), com base nas premissas da Organização Mundial da Saúde que incluem informações pertinentes à história clínica e laboratorial da paciente para investigação da infertilidade. Dados complementares foram obtidos dos prontuários e fichas clínicas armazenados na Sessão de Arquivos Médicos e Informação em Saúde (SAMIS) do Hospital das Clínicas.

Foram incluídas no estudo mulheres em idade reprodutiva atendidas no LabRep, com histórico de infertilidade e com diagnóstico da causa da infertilidade, que foram submetidas ao teste padrão para oclusão tubária

(histerosalpingografia ou laparoscopia diagnóstica). As pacientes deveriam ter sido submetidas a teste para a detecção de CT e NG utilizando-se o método PCR em amostra de urina. Pacientes que não se enquadraram nesses critérios foram excluídas do estudo.

Variáveis categorizadas: casos de infecção por CT e NG, idade, local de residência, tempo de infertilidade, tipo de infertilidade, fator de infertilidade, número de filhos, número de abortos, diagnóstico de obstrução tubária e de DIP.

O tamanho da amostra foi calculado baseado em dados de outros estudos brasileiros que indicam 2% de infecção por NG na população. Optou-se pela prevalência da gonorreia por ser menor do que a prevalência da clamídia. Utilizou-se o programa OpenEpi[®], que calculou 335 mulheres para o estudo, com intervalo de 95% de confiança (IC95%) e 80% de poder do teste, aceitando-se variabilidade de $\pm 0,3\%$. Além disso, foram considerados o número de pacientes cadastradas no LabRep e o fluxo mensal de pacientes.

O programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 20, foi utilizado para as análises estatísticas. Para variáveis quantitativas, utilizou-se média e desvio padrão (DP) e, para variáveis qualitativas, distribuição de frequências. Foram utilizados o teste do χ^2 ou exato de Fisher para avaliar a associação entre as variáveis; *Odds Ratio* (OR) e intervalos de confiança foram calculados para estimar o grau de associação entre a infecção e variáveis independentes com erro tipo I pré-fixado em 5%, considerando-se significante quando $p < 0,05$.

Resultados

Foram analisados 352 prontuários de mulheres admitidas no serviço do Laboratório de Reprodução Humana, que procuraram tratamento para infertilidade no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2012. Destes, 12 foram excluídos por inconsistência dos dados, restando 340 pacientes que se enquadraram nos critérios de inclusão.

A Tabela 1 apresenta os dados referentes às características clínicas e epidemiológicas. A média de idade das pacientes foi de $32,9 \pm 5,4$ anos (intervalo de 20 a 47 anos). Foram encontrados 37 casos de infecção por clamídia e 2 casos de coinfeção por gonococo. Mulheres com idade ≤ 35 anos apresentaram maior frequência de infecção por CT (62,2%) e os 2 casos de coinfeção por NG.

A maioria das pacientes atendidas reside na capital de Goiás (70,6%); outras, em municípios do interior do estado, abrangendo as cidades da região metropolitana de Goiânia. Das 340 mulheres, a maioria relatava até 5 anos de infertilidade (53,9%). Entretanto, 20 casos de infecção por CT foram encontrados em mulheres com mais de 10 anos de infertilidade, e os 2 casos de coinfeção com

NG foram em mulheres com ≤ 5 anos de infertilidade ($p < 0,0001$), confirmando resultados anteriores do nosso laboratório^{4,17}. Quanto ao tipo de infertilidade, 53,9% apresentam infertilidade secundária. Esse mesmo grupo apresentou a maioria dos casos de infecção por CT (51,4%).

O fator de infertilidade mais frequentemente observado foi o tubário (41,2%), e 56,8% dessas mulheres apresentaram infecção por CT (1 caso com coinfeção por NG). Alguns casos apresentaram 2 ou mais fatores

Tabela 1. Características sociais, demográficas e reprodutivas das mulheres incluídas no estudo

Variável	CT n (%)	NG n*	Ausência n (%)	Total n (%)	Valor p
Casos	37 (10,9)	2	303 (89,1)	340 (100)	
Idade (anos)					
35	23 (62,2)	2	212 (70,0)	235 (69,1)	0,5
>35	14 (37,8)	–	91 (30,0)	105 (30,9)	
Residência					
Capital	26 (70,3)	2	214 (70,6)	240 (70,6)	0,5
Outro local	11 (29,7)	–	89 (29,4)	100 (29,4)	
Tempo de infertilidade (anos)					
5	8 (21,6)	2	175 (57,8)	183 (53,9)	<0,0001**
6–9	9 (24,3)	–	85 (28,1)	94 (27,6)	
10	20 (54,1)	–	43 (14,1)	63 (18,5)	
Tipo de infertilidade					
Primária	18 (48,6)	1	139 (45,9)	157 (46,1)	0,8
Secundária	19 (51,4)	1	164 (54,1)	183 (53,9)	
Fator de infertilidade***					
Masculino	10 (27)	–	67 (22,1)	77 (22,6)	0,04*
Tubário	21 (56,8)	1	119 (39,2)	140 (41,2)	
Uterino	7 (18,9)	–	36 (11,9)	43 (12,6)	
Ovulatório	4 (10,8)	–	42 (13,9)	46 (13,5)	
Hiperprolactinemia	1 (2,7)	–	11 (3,6)	12 (3,5)	
Tireoide	–	–	8 (2,6)	8 (2,3)	
Imunológico	–	–	2 (0,6)	2 (0,6)	
Sistêmico	–	–	7 (2,3)	7 (2,1)	
Anomalia congênita	–	–	2 (0,6)	2 (0,6)	
Idiopática	–	1	70 (23,1)	70 (20,6)	
Nº de filhos					
0	18 (48,6)	2	182 (60,1)	200 (58,8)	0,5
1–3	19 (51,4)	–	115 (37,9)	134 (39,4)	
4	–	–	6 (2)	6 (1,8)	
Nº de abortos					
0	30 (81,1)	1	263 (86,8)	293 (86,2)	0,4
1–3	7 (18,9)	1	37 (12,2)	44 (12,9)	
4	–	–	3 (1)	3 (0,9)	
Obstrução tubária					
Não	12 (32,4)	–	176 (58,1)	188 (55,3)	0,004*
Sim	25 (67,6)	2	127 (41,9)	152 (44,7)	
Doença inflamatória pélvica					
Não	30 (81,1)	–	303 (100)	333 (97,9)	0,8
Sim	7 (18,9)	2	–	7 (2,1)	

CT: *Chlamydia trachomatis*, NG: *Neisseria gonorrhoeae*; * todos os casos foram de coinfeção com *Chlamydia trachomatis*; ** estatisticamente significante; *** casos com mais de uma causa para infertilidade.

para a causa da infertilidade ($p=0,04$). É interessante ressaltar que, mesmo entre os casos em que a causa da infertilidade era masculina, se encontraram 10 casos de mulheres com infecção por CT (27%).

Quanto ao número de filhos, a maioria dos casos positivos para infecção por CT foi diagnosticada no grupo de multigestas (51,4%). Do total da amostra, 86,2% não tinham história de abortamentos. Todavia, foi nesse grupo que ocorreu o maior número de casos de infecção por CT (81,1%). Nenhuma das duas pacientes com coinfeção por NG tinha filhos, porém uma delas havia apresentado gravidez ectópica.

Os testes para oclusão tubária indicaram que 55,3% das pacientes apresentam trompas permeáveis. Contudo, no grupo com obstrução, houve 67,6% de casos positivos para infecção por CT e 2 casos de coinfeção por NG ($p=0,004$; OR=2,9; IC95% 1,4–6,0). Apenas 2,1% das pacientes apresentaram DIP, mas a maior parte dos casos de infecção por CT foi detectada em mulheres que não apresentam DIP (81,1%).

Discussão

Em serviços públicos brasileiros que oferecem tratamento gratuito para reprodução assistida, a procura vem aumentando devido aos custos dos procedimentos e, dessa forma, as mulheres enfrentam uma fila de espera^{5,19}. Em geral, as pacientes procuram o serviço de reprodução assistida com idade superior a 30 anos, como foi observado no Distrito Federal (63%)¹⁹, em São Paulo (68,7%)⁵ e no presente estudo (66,8%).

Outro fator pertinente é que as mulheres buscam os centros de reprodução assistida com idade mais avançada e, devido ao tempo de espera pelo tratamento, passam a fazer parte do grupo de mulheres em idade reprodutiva avançada, já que, após os 35 anos, a taxa de fertilidade diminui progressivamente, reduzindo as chances de sucesso do tratamento^{5,19-21}.

A prevalência de infecção por CT observada neste estudo (10,9% em mulheres de 20 a 47 anos) está de acordo com o descrito em outras investigações realizadas no Brasil e se enquadra na faixa divulgada pelo Ministério da Saúde. Entre pacientes de uma clínica de reprodução em São Paulo, houve 1,1% de prevalência de CT. A baixa prevalência observada foi justificada devido aos tratamentos prévios prescritos para DST para as pacientes inclusas nesse estudo⁵. Contudo, observou-se 52,8% de infecção por CT em pacientes na clínica de reprodução em Manaus devido à inclusão de pacientes com fator tubário¹⁶.

Um grande estudo de base populacional multicêntrico, realizado em cinco regiões do país, evidenciou prevalência de 9,4% de infecção por CT em 2.913 mulheres gestantes e 7,3% em 2.032 pacientes da clínica

de DST. Outro resultado relevante é que a prevalência foi inversamente proporcional à idade, mas com diferenças significativas em relação às regiões estudadas²². As diferenças entre as regiões do Brasil, levando-se em conta o acesso aos serviços de saúde, podem contribuir para a prevalência de infecções por CT.

Em relação à prevalência da NG, observamos apenas dois casos de coinfeção na amostra incluída no estudo. Essa porcentagem é, porém, semelhante à encontrada em outras investigações que incluíram casos na mesma faixa etária e empregando a mesma técnica diagnóstica^{5,14,23-25}. Em uma clínica de planejamento familiar em Salvador, Bahia, a prevalência de infecção por NG foi de apenas 0,5%²⁴. Entre grávidas, descreve-se prevalência de NG de 1,5% entre mulheres atendidas em clínica de atendimento primário²², além de 4% detectados em Minas Gerais²⁵ e 1,9% em São Paulo¹⁴.

Entre 10 e 30% das pacientes com gonorreia apresentam infecção concomitante por clamídia^{8,9}. No presente estudo, 2 mulheres tiveram infecção confirmada por CT e NG, correspondendo a 0,6% de coinfeção. Entre pacientes atendidas em clínica de atendimento primário em São Paulo, a taxa de coinfeção foi de 0,12%¹⁴. Entre as gestantes, observou-se 3,7% de infecção pelos 2 agentes²⁶ e, entre as mulheres atendidas em uma clínica de DST, essas taxas de coinfeção variaram de 2,2% a 13%²⁷. Como as infecções por CT e NG estão associadas em muitos casos, sempre que uma delas é diagnosticada, o tratamento deve ser feito para ambos os agentes²⁸.

No LabRep são atendidos casais provenientes de diversas cidades do Estado de Goiás. A região Sudeste do Brasil concentra a maioria das clínicas de reprodução assistida, tanto particulares quanto as que oferecem serviços subsidiados pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Há uma grande concentração de clínicas em São Paulo, mas outros estados brasileiros são carentes desse tipo de serviço. Em geral, os serviços públicos estão associados a centros acadêmicos ou universidades, assim como o serviço no qual foi realizado o presente estudo.

O elevado número de casos de infertilidade secundária observados neste estudo se dá pelo fato de que há uma demanda crescente de mulheres que chegam ao serviço em busca da reanastomose tubária. São mulheres jovens em um segundo casamento que desejam filhos do atual relacionamento²⁹. Muitas dessas laqueaduras podem ter sido realizadas com técnica que dificulta a cirurgia de reversão. A lei que regula esse tipo de esterilização reforça a utilização de técnicas mutiladoras para assegurar a eficácia^{12,30} e essas mulheres depositam esperanças nas técnicas de reprodução assistida. Desse modo, a esse contingente de mulheres laqueadas somam-se as pacientes com infertilidade por fator tubário, que inclui ainda outras causas, como a infecção por CT/NG, obstrução

tubária e DIP^{4,17}. Observou-se que a infecção por CT pode aumentar em 2,9 vezes a chance da paciente desenvolver uma obstrução tubária¹⁷.

Uma complicação comum na infecção por CT e NG em mulheres é a ocorrência da DIP, que advém da ascensão dos micro-organismos da endocérvice ao trato genital superior, incluindo endométrio, tubas e estruturas contíguas³¹. A inflamação e as cicatrizes tubárias causadas pela infecção constituem um forte fator de risco para gravidez ectópica e infertilidade por fator tubário¹⁷. A DIP é causa de infertilidade em pelo menos 15% das mulheres inférteis americanas e um problema ainda maior entre as mulheres na África³². Os resultados do presente estudo evidenciaram sete casos de DIP, todos com infecção por CT, dos quais dois com coinfeção por NG.

As infecções por CT e NG são DST que afetam a fertilidade feminina e, devido à evolução assintomática,

o diagnóstico não é feito em até 80% dos casos, prejudicando o tratamento precoce da infecção^{4,6,17}. Resoluções da Diretoria Colegiada da ANVISA e resoluções do Conselho Federal de Medicina recomendam o rastreamento de clamídia, assim como exames para detecção de outras DST. A investigação desses agentes microbianos deve ser solicitada durante propedêutica do casal infértil.

Os resultados do presente estudo evidenciaram a associação da obstrução tubária com a infecção por CT e NG. Esses achados reforçam a necessidade de estratégias efetivas de detecção precoce das DST entre mulheres assintomáticas. Faltam no Brasil campanhas para esclarecimento e prevenção em relação às DST e à infertilidade — a qual, muitas vezes, é consequência de DST tratáveis e que afetam principalmente a população jovem de menor renda.

Referências

- Ovalle A, Martínez MA, de la Fuente F, Falcon N, Feliú F, Fuentealba F, et al. Prevalencia de infecciones de transmisión sexual en mujeres embarazadas atendidas en un hospital público de Chile. *Rev Chil Infect*. 2012;29(5):517-20.
- World Health Organization (WHO). Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections – 2008: overview and estimates. Geneva: WHO; 2012.
- de Lima YA, Turchi MD, Fonseca ZC, Garcia FL, Cardoso FA, Reis MN, et al. Sexually transmitted bacterial infections among young women in Central Western Brazil. *Int J Infect Dis*. 2014;25:16-21.
- Approbato FC, Approbato MS, Florêncio R, Maia MC, Silva TM. Razão de chance elevada para gravidez ectópica em pacientes com obstrução tubária atendidas em clínica de fertilização assistida. *JBRA Assist Reprod*. 2012;16(1):32-4.
- Pantoja M, Campos EA, Pitta DR, Gabiatti JE, Bahamondes MV, Fernandes AM. [Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection among women candidates for in vitro fertilization at a public institution of the State of São Paulo, Brazil]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2012;34(9):425-31. Portuguese.
- Piazzetta RC, Carvalho NS, Andrade RP, Piazzetta G, Piazzetta SR, Carneiro R. [Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoea* infections in sexual actives young women at a southern Brazilian city]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2011;33(11):328-33. Portuguese.
- Miron ND, Socolov D, Mares M, Anton G, Nastasa V, Moraru RF, et al. Bacteriological agents which play a role in the development of infertility. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2013;60(1):41-53.
- Arráiz RN, Ginestre PM, Perozo MA, Castellano GM, Urdaneta B, García GM. Diagnóstico molecular y prevalencia de infecciones por *Chlamydia trachomatis* en pacientes sintomáticas y asintomáticas de una población del estado de Zulia, Venezuela. *Rev Chil Infect*. 2007;24(1):48-52.
- Toyer AL, Trignol-Viguier N, Mereghetti L, Joly B, Blin E, Body G, et al. Interest of simultaneous *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* screening at the time of preabortion consultation. *Contraception*. 2012;86(5):572-6.
- Sirota I, Zarek SM, Segars JH. Potential influence of the microbiome on infertility and assisted reproductive technology. *Semin Reprod Med*. 2014;32(1):35-42.
- Gray-Swain MR, Peipert JF. Pelvic inflammatory disease in adolescents. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2006;18(5):503-10.
- Cevrioglu AS, Degirmenci B, Acar M, Yilmazer M, Erol D, Kahraman A, et al. Examination of changes caused by tubal sterilization in ovarian hormone secretion and uterine and ovarian artery blood flow rates. *Contraception*. 2004;70(6):467-73.
- Oliveira FA, Pflieger V, Lang K, Heukelbach J, Miralles I, Fraga F, et al. Sexually transmitted infections, bacterial vaginosis, and candidiasis in women of reproductive age in rural Northeast Brazil: a population-based study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(6):751-6.
- Luppi CG, Oliveira RL, Veras MA, Lippman SA, Jones H, Jesus CH, et al. Diagnóstico precoce e os fatores associados às infecções sexualmente transmissíveis em mulheres atendidas na atenção primária. *Rev Bras Epidemiol*. 2011;14(3):467-77.
- Cook RL, Hutchison SL, Østergaard L, Braithwaite RS, Ness RB. Systematic review: noninvasive testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Ann Intern Med*. 2005;142(11):914-25.
- de Lima Freitas NS, Borborema-Santos CM, Barroso Serrão das Neves D, Costa de Oliveira CM, Dutra Ferreira JR, Astolfi-Filho S. High prevalence detection of *Chlamydia trachomatis* by polymerase chain reaction in endocervical samples of infertile women attending university hospital in Manaus-Amazonas, Brazil. *Gynecol Obstet Invest*. 2011;72(4):220-6.
- Maia MC, Approbato MS, Florêncio RS, Silva TM, Approbato FC. *Chlamydia trachomatis*: consequências na saúde reprodutiva da mulher. *JBRA Assist Reprod*. 2011;15(6):30-5.
- Araújo RS, Guimarães EM, Alves MF, Sakurai E, Domingos LT, Fioravante FC, et al. Prevalence and risk factors for *Chlamydia trachomatis* infection in adolescent females and young women in central Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;25(6):397-400.

19. Samrslu M, Nunes JC, Kalume C, Cunha AC, Garrafa V. Expectativa de mulheres à espera de reprodução assistida em hospital público do DF - estudo bioético. *Rev Assoc Med Bras*. 2007;53(1):47-52.
20. Bayrampour H, Heaman M, Duncan KA, Tough S. Advanced maternal age and risk perception: a qualitative study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2012;12:100.
21. Kenny LC, Lavender T, McNamee R, O'Neill SM, Mills T, Khashan AS. Advanced maternal age and adverse pregnancy outcome: evidence from a large contemporary cohort. *PLoS One*. 2013;8(2):e56583.
22. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Prevalências e frequências relativas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras, 2005. Brasília: Ministério da Saúde; 2008.
23. Ramos MC, Becker D, Germany C, Sander MA, Stein A, Fagundes RA, et al. Estudo populacional de prevalência de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* por PCR em urina de mulheres residentes em Vila Popular atendidas por Serviço de Saúde Comunitária em Porto Alegre, Brasil. *DST J Bras Doenças Sex Transm*. 2003;15(2):20-5.
24. Codes JS, Cohen DA, Melo NA, Teixeira GG, Leal AS, Silva TJ, et al. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em ambientes clínicos e não clínicos na Cidade de Salvador, Bahia, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2006;22(2):325-34.
25. Rodrigues MM, Fernandes PA, Haddad JP, Paiva MC, Souza MC, Andrade TC, et al. Frequency of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* species in cervical samples. *J Obstet Gynaecol*. 2011;31(3):237-41.
26. Martins TA, Bello PY, Pontes LR, Costa LV, Miralles IS, Queiroz TR. As doenças sexualmente transmissíveis são problemas entre gestantes no Ceará? *DST J Bras Doenças Sex Transm*. 2004;16(3):50-8.
27. Benzaken AS, Sales DN, Palheta Junior JI, Pedrosa VL, Garcia EG. Prevalência da infecção por Clamídia e Gonococo em mulheres atendidas na Clínica de DST da Fundação Alfredo da Matta, Manaus, Amazonas. *DST J Bras Doenças Sex Transm*. 2010;22(3):129-34.
28. Fernandes AM, Daher G, Nuzzi RX, Petta CA. [*Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* among women in a family planning clinic]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009;31(5):235-40. Portuguese.
29. Ribeiro SC, Tormena RA, Bedin AA, Giribela CR, Izzo CR, Santos NC, et al. [Laparoscopic tubal anastomosis: preliminary results]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2002;24(5):337-41. Portuguese.
30. Nicolau AI, de Moraes ML, Lima DJ, de Sousa Aquino P, Pinheiro AK. [Tubal ligation: the characterization of sterilized users of a public service]. *Rev Esc Enferm USP*. 2011;45(1):55-61. Portuguese.
31. Herzog SA, Heijne JC, Althaus CL, Low N. Describing the progression from *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* to pelvic inflammatory disease: systematic review of mathematical modeling studies. *Sex Transm Dis*. 2012;39(8):628-37.
32. Wiesenfeld HC, Sweet RL, Ness RB, Krohn MA, Amortegui AJ, Hillier SL. Comparison of acute and subclinical pelvic inflammatory disease. *Sex Transm Dis*. 2005;32(7):400-5.

Effects of hyperprolactinemia and ovariectomy on the tibial epiphyseal growth plate and bone formation in mice

Efeitos da hiperprolactinemia e ooforectomia sobre o disco epifisário da tíbia e formação óssea em camundongos fêmeas

Original Article

Keywords

Growth plate/metabolism
Tibia/metabolism
Ovariectomy
Hyperprolactinemia
Hyaline cartilage

Palavras-chave

Lâmina de crescimento/metabolismo
Tíbia/metabolismo
Ovariectomia
Hiperprolactinemia
Cartilagem hialina

Abstract

PURPOSE: To evaluate the effects of ovariectomy and the hyperprolactinemia procedure in the tibial epiphyseal growth plate of female mice. **METHODS:** In this study, the epiphyseal growth plate of ovariectomized (OVX) and/or rendered hyperprolactinemic female mice by 50 days of treatment with 200 µg metoclopramide (M) was evaluated morphologically, morphometrically and immuno-histochemically. Forty female and adult mice were divided into four groups according to treatment: V group — animals treated with saline solution; H group — hyperprolactinemic animals; OvX/V group — ovariectomized animals and treated with saline solution; OvX/H group — hyperprolactinemic and ovariectomized animals. After the treatment period, the animals were sacrificed, tibia was removed and fixed in 10% buffered formalin and decalcified in 10% formic acid. The material was immersed in paraffin and subjected to histological processing in paraffin. The sections were stained with Masson's trichrome and immunohistochemistry was carried out for the pro-apoptotic protein BCL-2. The images for the morphological and morphometric study were analyzed with the imaging program AxioVision 4.8 (Carl-Zeiss®, Germany). **RESULTS:** The combination of hyperprolactinemia and the ovariectomy procedure decreased the number of resting chondrocytes 1.5-fold, the number of proliferative chondrocytes 1.8-fold; the percentage of resting cartilage 2.4-fold and the percentage of trabecular bone 2.1-fold, compared with respective control animals. **CONCLUSION:** The procedure of ovariectomy combined with the metoclopramide-induced hyperprolactinemia in female mice has showed marked bone degeneration due to significant decrease of cell proliferation in the epiphyseal growth plate and bone formation.

Resumo

OBJETIVO: Avaliar os efeitos do procedimento de ooforectomia e da hiperprolactinemia no disco epifisário da tíbia de camundongos fêmeas. **MÉTODOS:** Neste estudo, o disco epifisário de camundongos fêmeas ovariectomizadas (OVX) e/ou com hiperprolactinemia induzida por tratamento com 200 µg de metoclopramida por 50 dias (M) foi avaliado morfológicamente, morfometricamente e imunohistoquimicamente. Quarenta camundongos fêmeas e adultas foram divididas em quatro grupos, segundo o tratamento: Grupo V — animais tratados com solução salina; Grupo H — animais hiperprolactinêmicos; Grupo OvX/V — animais ooforectomizados e tratados com o solução salina; Grupo OvX/H — animais ooforectomizados e hiperprolactinêmicos. Após o período de tratamento, os animais foram sacrificados, as tíbias removidas e fixadas em formalina tamponada a 10% e descalcificadas em ácido fórmico a 10%. O material foi emblocado em parafina e submetido a processamento histológico em parafina. Os cortes foram corados pelo tricrômico de Masson e foi feita a imunohistoquímica para a proteína pró-apoptótica BCL-2. As imagens para o estudo morfológico e morfométrico foram analisadas com o programa de imagem AxioVision 4.8 (Carl-Zeiss®, Alemanha). **RESULTADOS:** A combinação da hiperprolactinemia e do procedimento de ovariectomia levou à redução do número de condrócitos de repouso em 1,5 vezes; o número de condrócitos proliferativos em 1,8; a percentagem de cartilagem de repouso em 2,4, e a percentagem de osso trabecular em 2,1 vezes, em comparação com os respectivos animais controles. **CONCLUSÃO:** O procedimento de ooforectomia combinado com a condição de hiperprolactinemia induzida pela metoclopramida em camundongos fêmeas evidenciou degeneração óssea acentuada, devido à diminuição significativa da proliferação celular no disco epifisário e da formação óssea.

Correspondence

Roberta Bastos Wolff
Rua Borges Lagoa, 783, 3º andar, Conj. 31
Zip code: 04038-031
São Paulo (SP), Brazil

Received

06/20/2014

Accepted with modifications

07/15/2014

DOI: 10.1590/S0100-720320140005065

Department of Gynecology, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP), Brazil.

¹Department of Gynecology, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP), Brazil.

Conflict of interests: none.

Introduction

The bone formation through endochondral ossification is a process initiated by mesenchymal cell condensation, and it leads to the formation of a cartilaginous scaffold that will later be replaced by bone¹. The outcome of this process is chondrocyte differentiation that leads to proliferation, hypertrophy, and concomitant expression of specific genes of cartilaginous tissue². The terminal cartilage chondrocyte differentiation induces mineralization of cartilaginous extracellular matrix (ECM) and chondrocyte death by means of programmed cell death (PCD)³. However, in diarthroid joints, the cartilage scaffold is not fully replaced by bone. Two regions in these joints remain cartilaginous: the one that will be replaced (the growth plate) and the other that will never be replaced (articular cartilage)⁴. The growth plate is an epiphyseal hyaline cartilage located between the epiphysis and diaphysis of long bones, and it is responsible for the growth of these bones through an endochondral ossification process. This cartilage is divided into five distinct zones: resting, proliferative, hypertrophic, calcified, and ossified^{1,2}.

In the resting cartilage, the mesenchymal cells are flattened, isolated or paired with another cell, arranged irregularly in the matrix, and differentiated into proliferative chondrocytes³. In the proliferative cartilage, the chondrocytes that are already differentiated become flattened and are arranged within gaps in a longitudinal direction and have a typical columnar orientation. The cells in this cartilage zone are able to proliferate; this is one of the factors leading to longitudinal bone growth⁴. In the hypertrophic cartilage, the chondrocytes are still arranged within the gaps in longitudinal columns, but these columns are less organized than those in the proliferative cartilage zone. These chondrocytes are large in size as a result of the PCD process. The process of cartilage matrix mineralization begins by the release of intracellular calcium in vesicles^{2,4}. In the calcified cartilage, the cavities created by chondrocytes after apoptosis are invaded by blood capillaries and undifferentiated mesenchymal cells migrating from the adjacent connective tissue (perichondrium). These cells differentiate into osteoblasts to initiate bone matrix synthesis. Subsequently, the chondrocytes trapped in the mineralized matrix undergo apoptosis, and then cavities separated by thin strands of cartilage matrix begin to appear. Following this event, the formation of the bone marrow channel occurs via bone resorption activity of osteoclasts, which are responsible for resorption and remodeling of the bone^{1,5}. In the ossification zone, myeloid tissue and blood vessels invade the spaces created by the chondrocytes, and osteoblasts originating from the undifferentiated cells produce bone matrix on the residual cartilage matrix, giving rise to gaps and

channels. Thereafter, the osteoblasts become osteocytes, because they are entrapped in the bone matrix, and primary bone formation with complete calcification of the cartilaginous matrix is achieved⁶.

The processes of cellular proliferation and bone formation are influenced by several growth factors — epidermal growth factor (EGF) and platelet-derived growth factor (PDGF), sex steroids (estrogen, progesterone, and testosterone), and hormones (parathyroid hormone, growth hormone, and prolactin)^{7,8}.

Prolactin and its receptor are related to cell differentiation and proliferation as well as bone mineralization. Besides breast enlargement and stimulation of milk production by the mammary glands, prolactin also influences bone formation by calcium demand. Its action on cartilage and bone has been suggested because of the presence of prolactin receptors (PRL-R) in these tissues⁹. Metoclopramide has been used in treatments for 50 days to elicit experimental hyperprolactinemia (high levels of prolactin). There is evidence that hyperprolactinemia leads to hypogonadism with a consequent decrease in the levels of sex steroids, leading to the degeneration of cartilage and bone tissue in mice and humans^{10,11}.

Bilateral ovariectomy (OVX) is also used to induce hypogonadism and causes the degeneration of cartilage and bone in mice. However, the effects of hyperprolactinemia and OVX alone or in combination on cartilage and bone tissue are not well understood¹⁰. Therefore, the present study extends previous research in our laboratory¹² by investigating the effects of hyperprolactinemia and OVX on the epiphyseal cartilage of the growth plate and bone formation in female mice.

Methods

Forty adult female mice (*Mus musculus*), with ca. 100 days and 35 g birth weight, from facilities of Cedeme – Federal University of São Paulo (UNIFESP) Center for Development of Experimental Models, were employed. The animals were housed in plastic cages with metal bars and artificial lighting, with a photoperiod of 12 hours light/12 hours dark. They were fed with standard chow (Labina-Purina®, Paulínia, Brazil) and water *ad libitum*; the average environment temperature was 22°C.

All experimental protocols were approved by the Research Ethics Committee on Animal Experimentation of UNIFESP-EPM/project 1148/09 and the animals were maintained in accordance with the National Institutes of Health guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals¹³.

The vaginal smear of the animals was collected daily for a week for monitoring the regularity of the estrous cycle and the characterization of the estrous cycle phases by

Harris-Shorr staining cytological analysis¹⁴. Once observation of regular cycling as an indication of normal gonad activity was provided, the mice were randomly divided into 4 groups (n=10 animals for each group) and treated daily during 50 consecutive days, unless otherwise state, as follows: Vehicle (V): naïve controls, injected subcutaneously with 0.2 mL of the vehicle (saline solution – NaCl 0.9%); Metoclopramide rendered hyperprolactinemic (H): mice injected subcutaneously with 200 µg of metoclopramide (M) (Sigma®, St. Louis, United States) dissolved in 0.2 mL of the vehicle; Ovariectomized Vehicle (Ovx/V): Ovx mice treated subcutaneously with 0.2 mL of the vehicle; ovariectomized metoclopramide-hyperprolactinemic (Ovx/H): Ovx mice treated subcutaneously with 200 µg of M dissolved in 0.2 mL of the vehicle.

After being anesthetized with 16 mg/kg of xylazine (Anasedan® – Vetbrands Int, Florida, United States) and 16 mg/kg of ketamine (Dopalen® – Vetbrands Int, Florida, United States) subcutaneously, the animals were positioned ventrally, and an about 1.5cm length skin incision was made bilaterally. The ovaries, uterine horn tip and the ovarian adjacent fat were exteriorized and then ovaries and surrounding fat were sectioned. Stitches were made with a 3.0 silk thread (Ethicon® – Johnson & Johnson, New Jersey, United States). After the procedure, the animals were placed in individual cages and 10 mg/kg of an association of dipyrone, adifenine hydrochloride and promethazine hydrochloride (Lisador® – Farmasa, United States) were administered in drinking water. After a 7-day recovery period, vaginal smears were taken daily during 21 days to verify vaginal atrophy as indicative of female sex hormones depletion.

After 50 days of treatment, as already described, the mice were sacrificed by deep anesthesia (xylazine 20 mg/kg plus ketamine 100 mg/kg, Vetbrands Int, Florida, United States), subcutaneously. The animals were positioned dorsally and tibiae were taken. The bones were fixed in formaldehyde (10%) in phosphate buffer during 24 hours and decalcified in 10% formic acid. After that, they were dehydrated in increasing concentrations of alcohol, diaphanized in xylene and embedded in paraffin. Inclusion of longitudinal sections was performed and 5 µm thick slides were prepared for further analyses¹⁵.

The slides with the sections were immersed in xylene, then in absolute ethanol, and then in Harris haematoxylin for 5 minutes, in solution A (fuchsin acid, acetic acid and distilled water) for 5 minutes, in solution B (fosfomolibdic acid and distilled water) for 5 minutes, and finally in solution C (aniline blue, acetic acid and distilled water). After that, they were immersed 3 times in acetic acid 1%, and finally in ethanol, in xylene and mounted with coverslips and Ettelan® (Merck Chemicals, Germany)¹⁶.

Photomicrographs were taken from regions of the tibia in the proximal region of each slide using a field representative for each area and analyzed using a computerized system consisting of a light microscope (Carl Zeiss®, Germany), fitted to a high resolution camera – Axio Cam MRC (Carl Zeiss®, Germany) and a color video monitor (Samsung®, Korea). The images were obtained using the image analysis program AxioVision 4.8 (Carl Zeiss®, Germany). The morphological and morphometrical evaluation of the slides included: five regions of the epiphyseal growth plate at 400X objective, to obtain measures (µ) of total thickness and of each zone of cartilage (resting, proliferative and hypertrophic); five regions of the epiphyseal growth plate at 400X objective, to obtain the counting of chondrocytes in each zone of cartilage (resting, proliferative and hypertrophic) and four regions of the epiphyseal growth plate at 100X objective, using a Weibel's reticle of 36 points, which was superimposed on each image, to obtain the percentage of remaining cartilage, trabecular bone and bone marrow, determining the percentage of bone formation¹⁷.

The results (mean ± standard deviation) were analyzed by ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test with the computer program Prizma® (California, United States)¹⁸. Differences at p≤0.05 were taken as significant.

For immunohistochemistry analysis of the proapoptotic protein – BCL-2 antibody, sections were initially submitted to deparaffinization in xylene and alcohol series for 5 minutes, with subsequent recovery of antigenic sites on steam fluent (pot value) for 30 minutes. The slides were washed twice for 5 minutes in a shaker with 0.1 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.5 and then blocking endogenous peroxidase was carried out by immersion in hydrogen peroxide at 1% for 30 minutes, at room temperature. Then, the slides were washed again in PBS (2x 5 min) and blocking of nonspecific sites was performed with normal goat serum diluted in 0.2 M PBS, pH 7.4.

After incubation overnight at 4°C in a dark chamber with primary antibodies monoclonal anti-BCL-2 antibody (IMUNY™, Rheabiotech Ltda., Brazil) diluted 1:400 in PBS, the samples were subjected to repeated washes in PBS, and then incubated for 30 minutes at room temperature with secondary antibody anti-mouse IgG conjugated with biotin (LSAB 2 Kit, Dako) at a dilution of 1:400.

The samples were subsequently incubated with AB reagent (streptavidin-biotin complex, LSAB 2, DAKO) for 30 minutes at room temperature, and developed with DAB (Sigma ChemicalCo, St. Louis, MO, United States) for 1 minute at room temperature. The sections were then counterstained with Harris hematoxylin solution for 20 seconds, fixed in alcohol series – xylene and mounted with cover slip and mounting medium Permount (Fisher, United States).

Immunohistochemistry was performed at the Laboratory Rheabiotech/Imuny (Campinas, São Paulo, Brazil).

We adopted as negative control the absence of primary antibody and the appearance of brown cells and extracellular matrix of the growth plate for positive pattern. The results of the evaluation of the expression of BCL-2 antibody were qualitatively guaranteed by the presence of cell marking.

Results

Figure 1A shows the morphology of the mouse epiphyseal growth plate of the naïve control group (V). The chondrocytes of the epiphyseal growth plate cartilage are organized into morphologically distinct zones:

resting, proliferative, and hypertrophic. The area of the resting cartilage is characterized by a layer of flattened chondrocytes with small spaces between the cells. The proliferative cartilage is characterized by a large number of chondrocytes with small spaces between rows of flattened and arranged chondrocytes. Finally, the hypertrophic cartilage is characterized by small number of rounded and arranged chondrocytes.

In the group treated with metoclopramide (H; Figure 1B), the resting and proliferative cartilages have fewer and less organized chondrocytes with more spaces between them, and the hypertrophic cartilage has a larger number of chondrocytes, which are much more rounded and less arranged, in comparison with the control group.

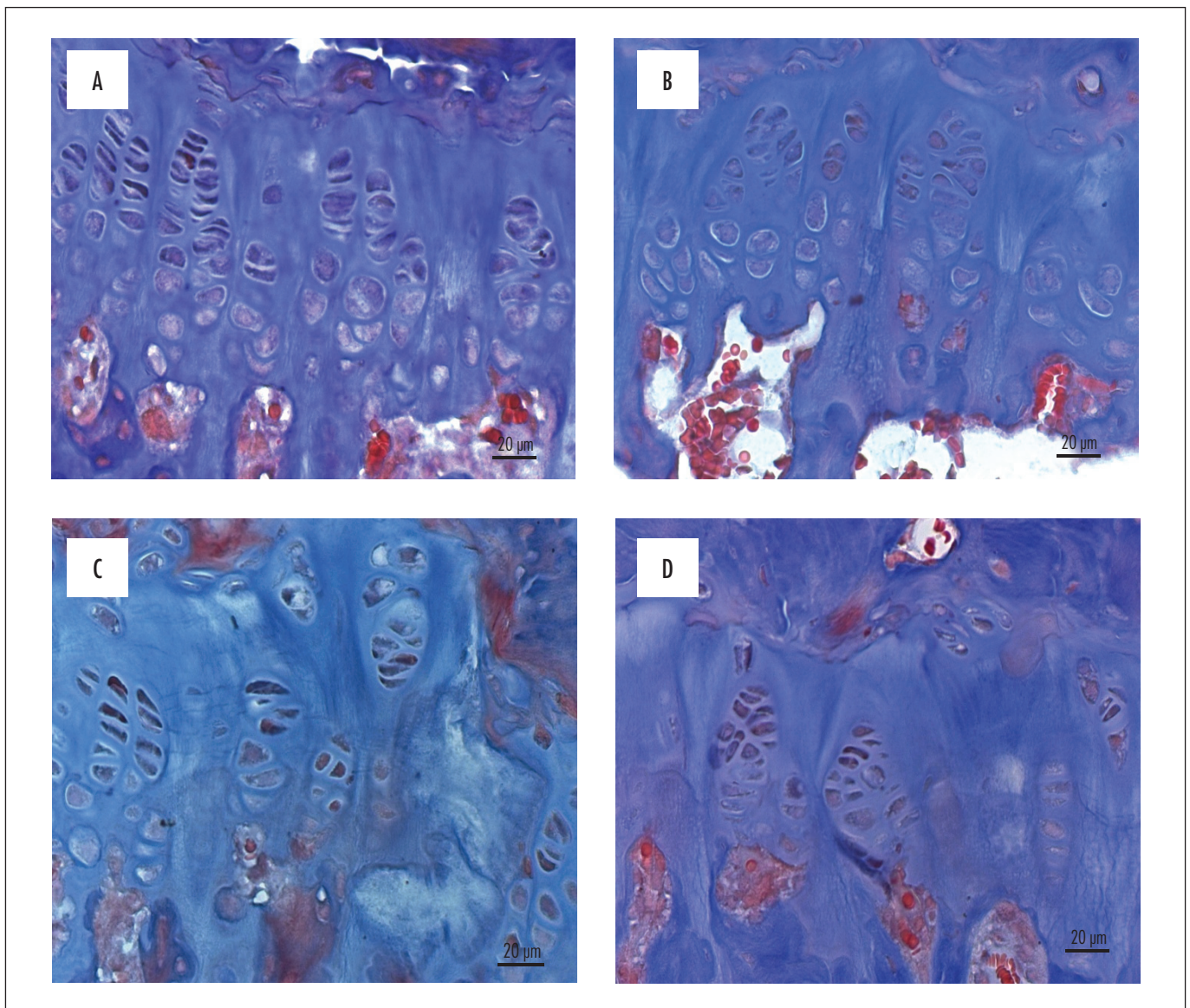


Figure 1. Photomicrographs of the tibial epiphyseal growth plate of the groups (n=10). (A) vehicle (V); (B) hyperprolactinemic (H); (C) ovariectomized vehicle (Ovx/V); (D) ovariectomized hyperprolactinemic (Ovx/H), with a 40X objective. Stained with Masson's trichrome.

In the group subjected to bilateral OVX and treated with vehicle (Ovx/V; Figure 1C), the resting and proliferative cartilages showed fewer disorganized flattened chondrocytes with larger spaces between them, and the hypertrophic cartilage showed a larger number of rounded and disorganized chondrocytes, in comparison with the control group.

In the group subjected to OVX and metoclopramide-hyperprolactinemia (Ovx/H; Figure 1D), the resting and proliferative cartilages showed few flattened, widely spaced, and disorganized chondrocytes in a small number of rows with large spaces between them, and the hypertrophic cartilage showed a great amount of rounded and disorganized chondrocytes, in comparison with the group treated only with metoclopramide-hyperprolactinemia (H).

The morphometrical results obtained from the evaluation of the resting cartilage percentage (Table 1; $p \leq 0.05$) showed that this percentage in the control (V) group (a) was not significantly different from that in the H and Oxv/V groups, but it was different from that in the Oxv/H group. In the evaluation of the trabecular bone percentage (Table 1; $p \leq 0.05$), in the V group (a), this percentage was significantly different from that in the H, Oxv/V, and Oxv/H groups; in the H group (b), this percentage was significantly different from that in the Oxv/V and Oxv/H groups. In the evaluation of the bone marrow percentage (Table 1; $p \leq 0.05$), in the V group (a), this percentage was significantly different from that in the H, Oxv/V, and Oxv/H groups; in the Oxv/V group (b), this percentage was significantly different from that in the Oxv/H group.

In the evaluation of the number of resting chondrocytes (Table 2; $p \leq 0.05$), the V group (a) had a larger number than the Oxv/V and Oxv/H groups; the H group (b) had a larger number than the Oxv/H group. Moreover, the Oxv/V group (c) also had a larger number than the Oxv/H group. In the evaluation of the number of proliferative chondrocytes (Table 2; $p \leq 0.05$), the V group (a) had a larger number than the H, Oxv/V, and Oxv/H groups; the H group (b) had a larger number than the Oxv/V and Oxv/H groups; and the Oxv/V group (c) had

a larger number than the Oxv/H group. In the evaluation of the number of hypertrophic chondrocytes (Table 2; $p \leq 0.05$), the numbers were not different between the V (a) and the H groups, but the V group had a smaller number than the Oxv/V and Oxv/H groups. In addition, the H group (b) had a smaller number than the Oxv/H group.

In the evaluation of the resting cartilage zone thickness (Table 3; $p \leq 0.05$), the V group (a) had a thicker zone than the H, Oxv/V, and Oxv/H groups; the Oxv/V group (b) had a thicker zone than the Oxv/H group. In the evaluation of the proliferative cartilage zone thickness (Table 3; $p \leq 0.05$), the V group (a) had a thicker zone than the H, Oxv/V, and Oxv/H groups; the H group (b) had a thicker zone than the Oxv/V and Oxv/H groups; and the Oxv/V group (c) had a thicker zone than the Oxv/H group. In the evaluation of the hypertrophic cartilage zone thickness (Table 3; $p \leq 0.05$), the V group (a) had a thicker zone than the H, Oxv/V, and Oxv/H groups; the H group (b) had a thicker zone than the Oxv/H group. In the evaluation of total cartilage thickness (Table 3; $p \leq 0.05$), the V group (a) had a thicker cartilage than the H, Oxv/V, and Oxv/H groups, and the Oxv/V group (b) had a thicker cartilage than the Oxv/H group.

The immunohistochemistry results (Figures 2A to 2D) showed only positive staining for early hypertrophic

Table 1. Analysis of the bone formation percentage ($p \leq 0.05$) of the groups

	Bone formation percentage			
	V	H	Ovx/V	Ovx/H
Resting cartilage	3.7 a	3.1	2.8	1.6
Trabecular bone	9.3 a	7.2 b	5.4	4.3
Bone marrow	21.1 a	27.7 b	25.6	30.0

V: vehicle; H: hyperprolactinemic; Oxv/V: ovariectomized vehicle; Oxv/H: ovariectomized hyperprolactinemic.

Groups: (A) resting cartilage (a - comparison with Oxv/H); (B) trabecular bone (a - comparison with H, Oxv/V and Oxv/H; b - comparison with Oxv/V and Oxv/H); (C) bone marrow (a - comparison with H, Oxv/V and Oxv/H; b - comparison with Oxv/H).

Table 2. Analysis of the chondrocytes number ($p \leq 0.05$) of the growth plate cartilage zones of the groups

	Analysis of the chondrocytes number			
	V	H	Ovx/V	Ovx/H
Resting chondrocytes	11.2 a	10.2 b	9.1 c	7.1
Proliferative chondrocytes	46.2 a	38.8 b	30.1 c	26.2
Hypertrophic chondrocytes	28.0 a	29.6 b	31.6	33.6

V: vehicle; H: hyperprolactinemic; Oxv/V: ovariectomized vehicle; Oxv/H: ovariectomized hyperprolactinemic.

Groups: (A) resting (a - comparison with Oxv/V and Oxv/H; b - comparison with Oxv/H); (B) proliferative (a - comparison with H, Oxv/V and Oxv/H; b - comparison with Oxv/V and Oxv/H; c - comparison with Oxv/H); (C) hypertrophic (a - comparison with Oxv/V and Oxv/H; b - comparison with Oxv/H).

Table 3. Analysis of the thickness (μm ; $p \leq 0.05$) of the growth plate cartilage zones of the groups

	Analysis of the cartilage zones thickness			
	V	H	Ovx/V	Ovx/H
Resting thickness	32.5 a	26.7	28.1 b	25.4
Proliferative thickness	52.0 a	41.2 b	33.9 c	30.8
Hypertrophic thickness	26.3 a	29.1 b	30.9	32.7
Total thickness	111.0 a	97.1	93.0 b	89.0

V: vehicle; H: hyperprolactinemic; Oxv/V: ovariectomized vehicle; Oxv/H: ovariectomized hyperprolactinemic.

Groups: (A) resting (a - comparison with H, Oxv/V and Oxv/H; b - comparison with Oxv/H); (B) proliferative (a - comparison with H, Oxv/V and Oxv/H; b - comparison with Oxv/V and Oxv/H; c - comparison with Oxv/H); (C) hypertrophic (a - comparison with H, Oxv/V and Oxv/H; b - comparison with Oxv/H); (D) total (a - comparison with H, Oxv/V and Oxv/H; b - comparison with Oxv/H).

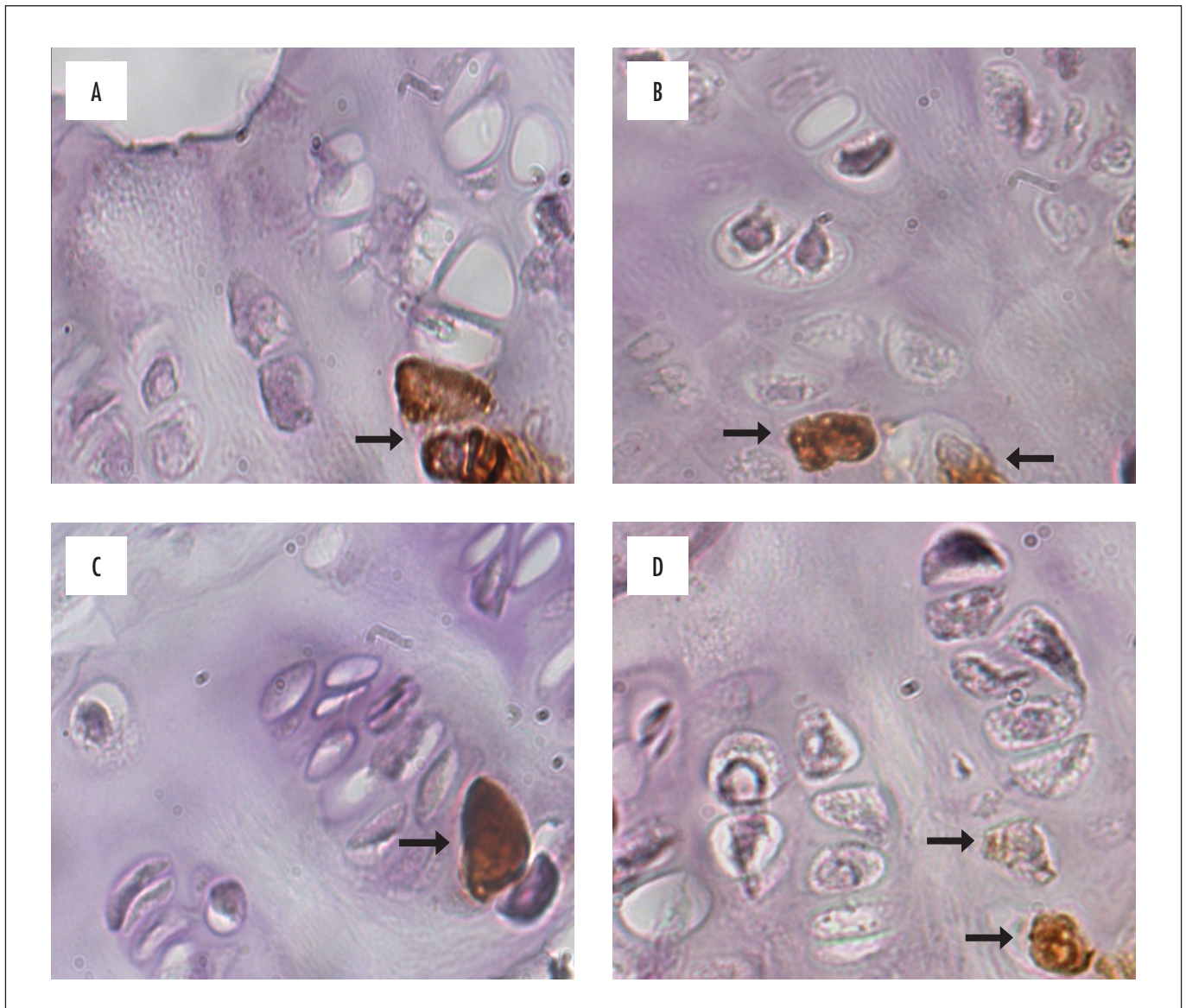


Figure 2. Photomicrographs of the tibial epiphyseal growth plate evidencing positive marking (arrows) for immunohistochemistry analysis of the proapoptotic protein - BCL-2 antibody. (A) vehicle (V); (B) hyperprolactinemic (H); (C) ovariectomized vehicle (Ovx/V); (D) ovariectomized hyperprolactinemic (Ovx/H), with a 100X objective.

chondrocytes and mature chondrocytes, and no proliferative chondrocytes were observed. This is because of the aging of the animals (Figure 2A), bilateral OVX (Figure 2B), and hyperprolactinemia (Figures 2C and 2D).

Discussion

The growth plate is responsible for the growth of long bones via the process of endochondral ossification, and it goes through a series of events called “bone turnover”⁶. These events lead to the formation of a cartilaginous scaffold that will be replaced by bone¹. The outcome of this process is chondrocyte differentiation leading to proliferation and hypertrophy that induces the mineralization of cartilaginous ECM and chondrocyte death by means of PCD^{2,3}.

Complex relationships exist between systemic factors and the paracrine, autocrine, and intrinsic influences that act together with the sex steroids to maintain cartilage homeostasis^{7,19}. Thus, disturbances in this network can lead to damage in the cartilage and result in inadequate bone formation³. Our data show that disturbances in this network occurred in mice following ovariectomy and hyperprolactinemia. The animals treated with the vehicle developed the best quality of the growth plate cartilage and bone. The ovariectomized animals developed poor quality cartilage and bone compared with the V group; after treatment with metoclopramide, the hyperprolactinemic animals developed poorer quality cartilage and bone than the other two groups. In fact, after treatment with metoclopramide, the ovariectomized

and hyperprolactinemic animals developed the poorest quality cartilage and bone compared with all the groups. This outcome can potentially have a negative impact on locomotor system functioning²⁰.

Upon bilateral OVX, the production of sex steroids, such as estrogen and testosterone, ceases¹². These steroids as well as progesterone are very important in the maintenance of cellular proliferation and bone formation²¹. If they are produced in lesser quantities in the body, the cartilage is greatly damaged and bone formation reduces, leading to very poor quality cartilage and bone²¹⁻²⁴.

The combination of OVX and hyperprolactinemia resulted in the lowest number of mesenchymal cells present in the resting cartilage zone, which is vital to counteract cartilage damage²⁰. This explains why this combined treatment results in the greatest cartilage degeneration and decreased bone formation, as observed in our experiments¹².

Prolactin acts in cartilage and bone through its local PRL-R. The transcription of these receptors is observed only in osteoblasts and not in osteoclasts. This fact suggests that prolactin is involved in bone formation and the maintenance of bone density by regulating calcium levels in conditions of increased demand, e.g., during gestation and lactation, and in an event of bone mass loss (osteoporosis)^{10,19,22,23,25}.

Prolactin secretion is maintained under hypothalamic inhibitory control mediated by the release of dopamine and the much more effective gamma-aminobutyric acid²⁶. Plasma concentrations of prolactin can vary and sometimes increase because of physiological, pathological, and pharmacological issues^{27,28}. Hyperprolactinemic states are related to decreased secretions of estrogen, progesterone, and testosterone (i.e., a hypogonadism-like state) followed by a decreased bone formation^{10,29}. As shown by the results reported in this study, metoclopramide-induced hyperprolactinemia¹² negatively affects the quality of cartilage.

A drastic reduction in sex steroid production resulting from the combination of OVX and hyperprolactinemia and the resulting hypogonadism diminished cellular proliferation of cells in the growth plate epiphyseal cartilage as well as diminished bone formation in the tibia, resulting in the strongest negative effect on bone quality.

Acknowledgement

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil (Author's Scholarship).

References

- Mackie EJ, Ahmed YA, Tartarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(1):46-62.
- Mackie EJ, Tartarczuch L, Mirams M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J Endocrinol.* 2011;211(2):109-21.
- Schrier L, Ferns SP, Barnes KM, Emons JA, Newman EI, Nilsson O, et al. Depletion of resting zone chondrocytes during growth plate senescence. *J Endocrinol.* 2006;189(1):27-36.
- Wuelling M, Vortkamp A. Chondrocyte proliferation and differentiation. *Endocr Dev.* 2011;21(3):1-11.
- Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep.* 2003;5(3):222-6.
- Lui JC, Nilsson O, Baron J. Growth plate senescence and catch-up growth. *Endocr Dev.* 2011;21:23-9.
- Provot S, Schipani E. Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;328(3):658-65.
- Lehnredt G, Unkel C, Metz KA, Jahnke K, Neumann A. Immunohistochemical evidence of BMP-2, -4 and -7 activity in otospongiosis. *Acta Otolaryngol.* 2008;128(1):13-7.
- Devi YS, Shehu A, Stocco C, Halperin J, Le J, Seibold AM, et al. Regulation transcription factors and repression of Sp1 by prolactin signaling through the short isoform of its cognate receptor. *Endocrinology.* 2009;150(7):3327-35.
- Chahal J, Schlechte J. Hyperprolactinemia. *Pituitary.* 2008;11(2):141-6.
- Carlsson A, Carlsson ML. Adaptive properties and heterogeneity of dopamine D(2) receptors - pharmacological implications. *Brain Res Rev.* 2008;58(2):374-8.
- Wolff RB, Gomes RC, Verna C, Maioral GC, Rampazo TC, Simões RS, et al. Molecular features of sexual steroids on cartilage and bone. *Rev Assoc Med Bras.* 2012;58(4):493-7.
- Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, et al. Ethical principles and practical use of experimental animals. São Paulo: Department of Psychobiology/Federal University of São Paulo School of Medicine; 2009.
- Shorr E. A new technic for staining vaginal smears: Ill, a single differential stain. *Science.* 1941;94(2449):545-6.
- Kiernan JA. *Histological and histochemical methods: theory and practice.* 3rd ed. London: Hodder Arnold; 2001.
- Masson P. Some histological methods. Trichrome staining and their preliminary technique. *J Tech Meth.* 1929;12(5):75-90.
- Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.* 2003;75(4):469-86.
- Fowler J, Cohen L. *Practical statistics for field biology.* Buckingham: Open University Press; 1990.
- Ganesan K, Balachandran C, Manohar BM, Puvanakrishnan R. Comparative studies on the interplay of testosterone, estrogen and progesterone in collagen induced arthritis in rats. *Bone.* 2008;43(4):758-65.

20. Wiwanitkit V. Macroprolactin and hyperprolactinaemia. *Malays J Pathol.* 2013;35(2):189.
21. Frenkel B, Hong A, Baniwal SK, Coetzee GA, Ohlsson C, Khalid O, et al. Regulation of adult bone turnover by sex steroids. *J Cel Physiol.* 2010;224(2):305-10.
22. Karimian E, Säwendahl L. Estrogen signaling in growth plate cartilage. *Endocr Dev.* 2011;21:42-51.
23. Weryha G, Angelousi A, Diehdiou D, Cuny T. [Bone and androgens]. *Presse Med.* 2014;43(2):180-5. French.
24. Ishida Y, Heersche JN. Progesterone stimulates proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in bone cell populations derived from adult female but not from adult male rats. *Bone.* 1997;20(1):17-25.
25. Irie T, Aizawa T, Kokubun S. The role of sex hormones in the kinetics of chondrocytes in the growth plate. A study in the rabbit. *J Bone Joint Surg Br.* 2005;87(9):1278-84.
26. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* 2000;80(4):1523-631.
27. Panzan MQ, Soares Júnior JM, Motta EL, Haapalainen EF, Simões MJ, Baptista HA, et al. Metoclopramide-induced hyperprolactinaemia caused marked decline in pinopodes and pregnancy rates in mice. *Hum Reprod.* 2006;21(10):2514-20.
28. Gomes RC, Verna C, Simões RS, Wolff RB, Baracat EC, Soares-Jr JM. Effects of metoclopramide on the mouse anterior pituitary during the estrous cycle. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(6):1101-4.
29. Okazaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M, Kido S, Ooka H, et al. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology.* 2002;143(6):2349-56.

Câncer cervical e de mama em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico

Breast and cervical cancer in patients with systemic lupus erythematosus

Artigo Original

Palavras-chave

Lúpus eritematoso sistêmico/complicações
Neoplasias
Colo do útero/patologia
Neoplasias do colo do útero/complicações
Neoplasias da mama/complicações

Keywords

Lupus erythematosus, systemic/complications
Neoplasms
Cervix uteri/pathology
Uterine cervical neoplasms/complications
Breast neoplasms/complications

Resumo

OBJETIVO: Estudar a frequência de neoplasias em uma amostra da população brasileira feminina com lúpus eritematoso sistêmico. **MÉTODOS:** Este é um trabalho retrospectivo de revisão de prontuários de 395 mulheres com lúpus eritematoso sistêmico, diagnosticadas pela presença de, pelo menos, 4 dos critérios classificatórios do Colégio Americano de Reumatologia para diagnóstico dessa doença e acompanhadas nos últimos 10 anos em um ambulatório especializado em Reumatologia. Foram coletados dados demográficos (idade e etnia das pacientes), dados acerca de duração de doença, de uso dos principais imunomoduladores e de diagnóstico de neoplasias. As informações obtidas foram tabuladas em tabelas de frequência e de contingência. A taxa de incidência de neoplasias nas mulheres com lúpus foi comparada com a da população em geral para a mesma região demográfica, nos últimos dez anos, utilizando, para isso, dados publicados pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA). A associação dos dados foi feita pelos testes de Fisher e do χ^2 , quando os dados eram nominais, e de Mann-Whitney, quando numéricos. Foi adotada a significância de 5%. **RESULTADOS:** Foram identificados 22 casos de tumores malignos (22 casos/395 ou 5,5% da amostra) sendo os mais comuns os de útero (10 casos/395 ou 2,5% da amostra) e de mama (9 casos/395 ou 2,2% da amostra). A presença de tumores estava associada com tempo de duração de doença ($p=0,006$), não sendo observada influência de tratamento com metotrexate ($p=0,1$), azatioprina ($p=0,9$), ciclofosfamida ($p=0,6$) e glicocorticoides ($p=0,3$). Os tumores de mama e de colo do útero foram mais comuns no lúpus eritematoso sistêmico do que na população em geral ($p<0,0001$ para ambos). **CONCLUSÃO:** Na presente amostra foi observada uma alta prevalência de tumores malignos, que foram mais comuns nas pacientes com maior tempo de doença. Os tumores mais frequentes foram os de mama e de útero, cuja incidência foi maior do que na população em geral. A presença de tumores não foi influenciada pelo uso de imunossuppressores nem glicocorticoides.

Abstract

PURPOSE: To study the incidence of tumors in a Brazilian sample of women with systemic lupus erythematosus. **METHODS:** This is a retrospective study of 395 medical charts from women with systemic lupus erythematosus diagnosed by the presence of at least 4 of the American College of Rheumatology classification criteria for the diagnosis of this disease and followed for the last 10 years in a rheumatology outpatient clinic. Demographic data (age and ethnicity of patients), data on disease duration, use of immunomodulators and on the presence of neoplasms were listed. Results are presented in frequency and contingency tables. The incidence rate of malignancies in women with lupus was compared with that of the general population for the same demographic region for the past ten years, using data published by the Brazilian National Cancer Institute (INCA). Association studies were carried out by the Fisher and χ^2 tests, when the data were nominal, and by Mann-Whitney test, when numeric. The level of significance was set at 5%. **RESULTS:** Twenty-two cases of malignant tumors were identified during these 10 years of follow-up (22 cases/395 or 5.5% of the sample), being the most common those of the uterine cervix (10 cases/395 or 2.5% of the sample) and breast cancer (9 cases/395 or 2.2% of the sample). The presence of tumors was associated with disease duration ($p=0.006$) and was not influenced by treatment with methotrexate ($p=0.1$), azathioprine ($p=0.9$), cyclophosphamide ($p=0.6$) and glucocorticoids ($p=0.3$). Breast and uterine cervix tumors were more common in systemic lupus erythematosus women than in the general population ($p<0.0001$ for both). **CONCLUSION:** A high prevalence of malignant tumors was found in this sample, with tumors being more common in patients with longer disease duration. The most frequent tumors affected the breast and uterus at a higher incidence than in the general population. The presence of tumors was not influenced by the use of glucocorticoids or immunosuppressors.

Correspondência

Thelma Larocca Skare
Rua Augusto Stelfeld, 1.908 – Bigarilha
CEP: 80730-150
Curitiba (PR), Brasil

Recebido

16/06/2014

Aceito com modificações

22/07/2014

DOI: 10.1590/S0100-720320140005052

Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba – HUEC – Curitiba (PR), Brasil.

¹Serviço de Reumatologia, Hospital Universitário Evangélico de Curitiba – HUEC; Curso de Medicina, Faculdade Evangélica do Paraná – Curitiba (PR), Brasil.

²Curso de Medicina, Faculdade Evangélica do Paraná – Curitiba (PR), Brasil.

Conflito de interesses: não há.

Introdução

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença de autoimunidade com preferência pelo gênero feminino, atingindo uma proporção de dez mulheres para um homem¹. Tal fato se deve, pelo menos em parte, à atuação dos estrógenos, que favorecem a proliferação de linfócitos T e B, aumentam a expressão de moléculas de adesão e reduzem a apoptose de células B autorreativas, além de favorecerem uma resposta imune do tipo Th2¹.

Com o advento de meios de diagnóstico precoce e de opções terapêuticas mais eficientes, as pacientes com LES têm tido um melhor prognóstico. A sobrevida em 10 anos passou de menos de 50% em 1955 para mais de 90% recentemente^{2,3}. Com isso, pode-se obter uma visão mais clara não só das lesões causadas pela doença e seu tratamento mas também de possíveis associações com outras entidades mórbidas, antes obscurecidas pela curta sobrevida.

Descreve-se que pacientes com LES têm maior prevalência de malignidades ressaltando-se, na literatura, a alta prevalência de tumores de linha linfóide e de colo do útero^{4,5}. O aumento da sobrevida no LES pode favorecer o aparecimento desses tumores não só pelo envelhecimento gradual da população, como também pelo fato de que tais pacientes ficam expostas, por mais tempo, a um ambiente de desregulação imune. Estudos em humanos e em animais demonstram que o microambiente da maioria dos tumores é altamente imunossupressor⁶. O aumento no perfil de citocinas Th2, principalmente da interleucina 10 (IL-10), o que é próprio do LES, favorece a tolerância do organismo a células epiteliais infectadas por papilomavírus humano (HPV), facilitando a progressão do câncer de colo do útero⁷.

Muitas neoplasias, assim como o próprio lúpus, são influenciadas por fatores genéticos^{1,8,9}. Sendo a população brasileira altamente miscigenada do ponto de vista étnico, ela apresenta um *background* genético peculiar, o que a torna única nesse aspecto¹⁰. Isso impede que muitas informações obtidas em populações mais homogêneas sejam válidas para o nosso contexto. O presente trabalho foi realizado com a finalidade de verificar a ocorrência de neoplasias em população de lúpus na região Sul do Brasil.

Métodos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa: número 253.532/Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba, Paraná. Uma amostra de 395 pacientes do gênero feminino com LES em acompanhamento pelo ambulatório de reumatologia de um único hospital terciário nos últimos dez anos foi estudada. Para que as pacientes fossem incluídas, elas deveriam ter pelo menos 4 dos critérios do Colégio

Americano de Reumatologia para classificação de LES¹¹ e diagnóstico dessa colagenose feito após os 16 anos. Foram excluídas as pacientes com lúpus juvenil e pacientes cujos prontuários estavam incompletos.

Este é um trabalho retrospectivo no qual dados demográficos, de perfil clínico e de tratamento da doença foram obtidos pela revisão dos prontuários. A pergunta acerca de aparecimento de tumores foi feita de maneira rotineira e anotada no prontuário, sendo os mesmos analisados até a obtenção desse dado.

A amostra estudada compunha-se de pacientes com diagnóstico do LES feito entre 16 e 88 anos de idade (mediana de 42 anos), com tempo de acompanhamento mediano de 105 meses (intervalo interquartil - IIQ 48–132 meses) e formada por 63,4% (167/263) de pacientes autodeclarados caucasianos e de 36,5% (96/263) de pacientes autodeclarados afrodescendentes. As características clínicas, sorológicas e de tratamento dessa amostra estão na Tabela 1.

Para a comparação dos achados da presente amostra com a população geral, foram utilizados dados dos últimos dez anos de incidência das principais neoplasias (mama e de colo do útero) na mesma região geográfica, através de relatórios do Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA)¹².

Os dados foram coletados em tabelas de frequência e de contingência. Medidas de tendência central foram expressas em média e desvio padrão (DP) quando a amostra era gaussiana, e mediana e intervalos interquartis nas não gaussianas. A normalidade de distribuição dos dados foi pesquisada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os testes de Fisher ou do χ^2 foram usados para estudo da associação entre presença de tumores e variáveis nominais, como etnia e tipo de tratamento utilizado, assim como para comparação de incidência de neoplasias entre a amostra de LES e a população geral. O teste *t* pareado ou de Mann-Whitney foi utilizado para a análise de associação de dados numéricos como os entre neoplasias com tempo de doença e com idade do paciente. Os testes foram calculados com auxílio do *software* Graph Pad Prism versão 5.0. A significância adotada foi de 5%.

Resultados

Na amostra estudada, ocorreram 22/395 casos de tumores malignos diagnosticados após o aparecimento do LES (5,5%). A distribuição da localização desses tumores pode ser encontrada na Tabela 2, onde se observa a preponderância de tumores de mama e de colo do útero.

Não foram observadas diferenças no número de tumores de acordo com a idade (idade mediana de 45,0 anos em pacientes com tumores *versus* 42,0 anos nos sem tumores; $p=0,2$), nem raça (caucasianos com $n=157/244$ ou 64,3% nos sem tumores e 10/19 ou 52,6% nos com tumores; $p=0,3$). O tempo

Tabela 1. Análise descritiva do perfil clínico, sorológico e de tratamento da amostra de 395 pacientes femininas com lúpus eritematoso sistêmico

	n/amostra	%
Perfil clínico*		
Erupção em borboleta	204/366	55,7
Lúpus discoide	66/358	18,4
Fotossensibilidade	295/389	75,8
Serosites (pleurite e/ou pericardite)	74/384	19,2
Anemia hemolítica	26/390	6,6
Leucopenia	108/384	28,3
Plaquetopenia	91/377	24,1
Psicose	19/389	4,8
Convulsão	41/392	10,4
Glomerulonefrite**		
Classe 6	11/162	
Classe 5	29/162	
Classe 4	66/162	
Classe 3	34/162	
Classe 2	22/162	
Perfil de autoanticorpos		
Fator antinuclear	395/395	100,0
Anticorpo anti-Ro	132/364	36,2
Anticorpo anti-La	65/362	17,9
Anticorpo anti-dsDNA	118/370	31,8
Anticorpo anti-RNP	81/283	28,6
Anticorpo anti-Smith	79/358	22,0
Anticardiolipina IgG	55/372	14,7
Anticardiolipina IgM	43/368	11,6
Anticoagulante lúpic	46/312	14,7
Perfil de tratamento***		
Antimaláricos	322/395	81,5
Azatioprina	141/395	35,6
Ciclofosfamida	98/395	24,8
Metotrexate	81/395	20,5
Prednisona	259/395	65,5
Talidomida	14/395	3,5

*Um achado clínico foi considerado como positivo quando de acordo com os critérios classificatórios do Colégio Americano de Reumatologia para diagnóstico de LES¹¹; **todas as glomerulonefrites, exceto as da classe 6, possuíam comprovação por biópsia; dsDNA: DNA de dupla hélice; RNP: ribonucleoproteína; IgG: imunoglobulina G; IgM: imunoglobulina M; ***o tratamento considerado foi o realizado desde o diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico até a data de diagnóstico do tumor.

de duração da doença foi maior naqueles com presença de neoplasias ($p=0,006$), conforme pode ser visto na Figura 1.

O estudo da associação da presença de tumores com medicamentos utilizados para tratamento do LES pode ser encontrado na Tabela 3, onde se observa que nenhum deles influenciou na taxa de aparecimento de neoplasias.

Ao se comparar a incidência dos tumores mais comuns na amostra estudada com dados de projeção do INCA dos últimos 10 anos para mesma região¹², sendo esta de 71/100.000 de tumores de mama em 10 anos e de 16/100.000 dos tumores de colo de útero em 10 anos, encontrou-se que pacientes com LES tinham uma incidência de tumores de colo do útero e de mama maior do que a

Tabela 2. Tumores encontrados na população com lúpus eritematoso sistêmico (n=395)

	Amostra de pacientes com lúpus (total) n=395		Amostra de pacientes com lúpus e tumores n=22	
	n	%	n	%
Colo do útero	10	2,5	10	45,4
Mama	9	2,2	9	40,9
Ovário	1	0,2	1	4,5
Tireoide	1	0,2	1	4,5
Ósseo	1	0,2	1	4,5
Pele	1	0,2	1	4,5

Observação: uma paciente teve dois tumores.

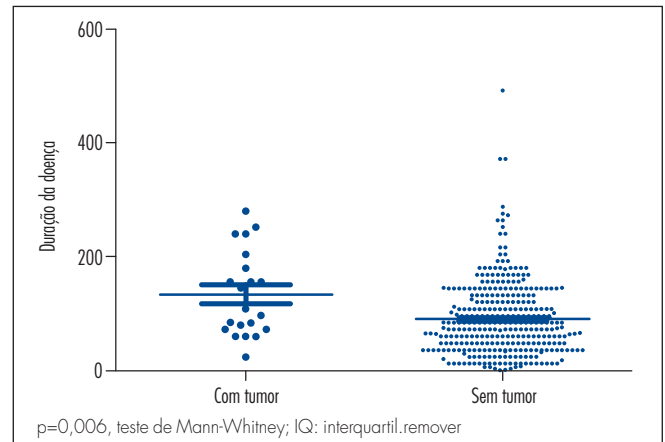


Figura 1. Comparação do tempo de duração da doença (em meses) em pacientes com tumores (mediana de 108 meses; intervalo interquartil 72,0–192,0 e sem tumor (mediana de 76 meses; intervalo interquartil 36,0–132,0); $p=0,006$, teste de Mann-Whitney; IQ: interquartil.remover

Tabela 3. Estudos de associação de medicamentos utilizados para tratamento do lúpus eritematoso sistêmico com a presença de tumores

Medicamento	Sem tumores n=373		Com tumores n=22		Valor p
	n	%	n	%	
Azatioprina	133	35,6	8	36,3	0,9
Metotrexate	74	19,8	7	31,8	0,1
Ciclofosfamida	94	25,2	4	18,1	0,6
Glicocorticoides	242	64,8	17	77,2	0,3
Talidomida	13	3,4	1	4,5	0,5

população geral, sendo $p<0,0001$ para ambos, com *odds ratio* (OR) de 10,4; intervalo de confiança de 95% (IC95%) de 9,1–11,96 para neoplasia de colo do útero e OR=3,4; IC95% 3,1–3,7 para neoplasia de mama.

Discussão

O aumento no câncer de colo do útero em pacientes com LES é fato reconhecido na literatura^{4,5}. Segundo Bernatsky et al.⁴ e Dreyer et al.⁵, esses pacientes não oferecem resistência contra a colonização pelo HPV. Acredita-se que isso ocorra secundariamente à imunodepressão causada pela própria doença e/ou pelo efeito imunossupressor

dos medicamentos utilizados em seu tratamento, principalmente metotrexate e ciclofosfamida^{4,5}. Em um estudo que incluiu pacientes brasileiras com LES, foi observado que essas tinham uma prevalência de infecções por HPV superior à dos controles (20,2 *versus* 7,3%)¹³. Nesse mesmo estudo, os fatores de risco identificados foram o número de parceiros e uso de imunossupressores¹³. No presente trabalho, não se observou associação de neoplasias com quaisquer das drogas usadas pelas pacientes. Entretanto, o tempo de imunodepressão causada pela própria doença pode ter contribuído para a elevada prevalência de neoplasias encontrada, já que houve associação entre o seu aparecimento e a duração do LES. Defeitos na imunidade celular e na resposta imune inata têm sido associados ao câncer de colo do útero^{14,15}. A resolução da infecção viral está, pelo menos parcialmente, na dependência da formação de anticorpos anti-HPV, recrutamento de macrófagos, células natural *killer* e de linfócitos T CD4 ativadas¹³. Essas funções estão prejudicadas em mulheres com LES¹³.

Apesar de a neoplasia de colo do útero ser considerada uma doença de países em desenvolvimento, no que se refere à sua ocorrência em pacientes com LES, essa diferença deixa de existir, havendo convergência da prevalência entre o Brasil e outros países desenvolvidos, como Dinamarca e América do Norte^{4,5}.

A vacinação contra o HPV pode ser uma opção protetora para esse grupo populacional. Ela é considerada segura para uso em indivíduos imunodeprimidos, uma vez que não contém organismos vivos; o antígeno utilizado é formado por proteínas obtidas através de tecnologia recombinante e específicas para cada tipo de HPV¹⁶. Todavia, existe a possibilidade de que o uso de imunossupressores e/ou de corticoides prejudique a sua imunogenicidade¹³. Existem poucos dados acerca da eficácia da vacina contra o HPV em mulheres com lúpus até o momento. Um estudo incluindo 50 mulheres com LES e 50 controles, submetidas ao uso da vacina quadrivalente, demonstrou que ela é segura e bem tolerada e que conseguiu causar conversão para os 4 sorotipos injetados entre 78 e 95% nas lúpicas contra 80–98% nos controles¹⁷. Outra pesquisa, com 20 pacientes lúpicas entre 12 e 26 anos, usando a vacina quadrivalente, confirmou que essa vacina é bem tolerada e que não causa aumento de atividade do lúpus; a imunogenicidade demonstrada foi excelente, existindo soroconversão de 94% da amostra para os antígenos das 4 cepas inoculadas¹⁸. Pelo exposto, compreende-se que a vacinação contra o HPV é uma necessidade premente em

pacientes com essa colagenose e que tais pacientes deveriam ser beneficiadas pelo sistema nacional de vacinação.

O câncer de mama tem sido descrito por outros autores como sendo menos comum entre as mulheres com lúpus do que na população em geral^{4,8,19}. A explicação oferecida é a de que o metabolismo dos estrógenos estaria alterado em pacientes com LES e que isso seria um fator protetor contra tumores dependentes desse hormônio⁴. Entretanto, existem argumentos contra tais afirmações. Um deles é o de que tem sido demonstrado que, em lúpus, os estrógenos atuam promovendo um aumento de função dos receptores de estrogênio (ER) α e não a sua diminuição¹⁹. Outro é o de que, segundo Tessier Cloutier et al.²⁰, são os tumores de mama ER negativos os que ocorrem menos frequentemente em pacientes com LES. Nossos resultados não confirmam o achado de uma menor prevalência de câncer de mama na população lúpica, demonstrando, ao contrário, o seu aumento. Tais achados necessitam ser confirmados por outras pesquisas. Uma justificativa para a discrepância entre os dados da literatura e os do estudo atual é a de que tanto o lúpus¹ quanto o câncer de mama⁸ estão sujeitos a influências genéticas, podendo essa associação ter uma expressão diferente na população brasileira. Além disso, podem influir nessa variabilidade outros componentes tais como tipo de dieta²¹, obesidade^{22,23}, níveis de vitamina D^{24,25} etc., os quais são peculiares a determinados grupos populacionais.

A natureza retrospectiva e a impossibilidade de se obter dados acerca da histologia dos tumores encontrados são algumas limitações do presente estudo. Pesquisas com amostragem superior, com desenho prospectivo e de pacientes acompanhadas por um período mais prolongado podem ajudar a esclarecer alguns aspectos dessa associação.

Concluindo, os autores ressaltam a necessidade de uma vigilância constante sobre aparecimentos de neoplasias de mama e de colo do útero em pacientes com LES. Isso pode ser conseguido pela conscientização de reumatologistas e ginecologistas acerca das associações aqui demonstradas, de medidas educativas para pacientes e de programas efetivos de rastreamento, os quais devem fazer parte do cuidado rotineiro oferecido a esse grupo de pacientes.

Contribuição dos autores

Thelma L. Skare: concepção do projeto, estudo estatístico, redação e revisão do texto.

Bruno V. Rocha: coleta de dados, revisão bibliográfica, redação e revisão do texto.

Referências

- Fortuna G, Brennan MT. Systemic lupus erythematosus: epidemiology, pathophysiology, manifestations, and management. *Dent Clin North Am.* 2013;57(4):631-55.
- Pistiner M, Wallace DJ, Nessim S, Metzger AL, Klinenberg JR. Lupus erythematosus in the 1980s: a survey of 570 patients. *Semin Arthritis Rheum.* 1991;21(1):55-64.
- Merrell M, Shulman LE. Determination of prognosis in chronic disease illustrated by systemic lupus erythematosus. *J Chronic Dis.* 1955;1(1):12-32.
- Bernatsky S, Kale M, Ramsey-Goldman R, Gordon C, Clarke AE. Systemic lupus and malignancies. *Curr Opin Rheumatol.* 2012;24(2):177-81.
- Dreyer L, Faurshou M, Mogensen M, Jacobsen S. High incidence of potentially virus-induced malignancies in systemic lupus erythematosus: a long-term follow up study in a Danish cohort. *Arthritis Rheum.* 2011;63(10):3032-7.
- Hellstrom KE, Hellstrom I. Vaccines to treat cancer—an old approach whose time has arrived. *J Cell Biochem.* 2007;102(2):291-300.
- Feng Q, Wei H, Morihara J, Stern J, Yu M, Kiviat N, et al. Th2 type inflammation promotes the gradual progression of HPV-infected cervical cells to cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2012;127(2):412-9.
- Bernatsky S, Ramsey-Goldman R, Foulkes WD, Gordon C, Clarke AE. Breast, ovarian, and endometrial malignancies in systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2011;104(9):1478-81.
- Dema B, Charles N. Advances in mechanisms of systemic lupus erythematosus. *Discov Med.* 2014;17(95):247-55.
- de Souza VS, Santos RV. The emergence of human population genetics and narratives about the formation of the Brazilian nation (1950-1960). *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci.* 2014 [ahead of print].
- Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40(9):1725.
- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA) [Internet]. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2014 [citado 2014 Abr 14]. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>>
- Klumb EM, Pinto AC, Jesus GR, Araujo M Jr, Jascone L, Gayer CR, et al. Are women with lupus at higher risk of HPV infection? *Lupus.* 2010;19(13):1485-91.
- Padula SJ, Clark RB, Korn JH. Cell-mediated immunity in rheumatic disease. *Hum Pathol.* 1986;17(3):254-63.
- Garred P, Voss A, Madsen HO, Junker P. Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Genes Immun.* 2001;2(8):442-50.
- Macartney KK, Chiu C, Georgousakis M, Brotherton JM. Safety of human papillomavirus vaccines: a review. *Drug Saf.* 2013;36(6):393-412.
- Mok CC, Ho LY, Fong LS, To CH. Immunogenicity and safety of a quadrivalent human papillomavirus vaccine in patients with systemic lupus erythematosus: a case-control study. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(5):659-64.
- Soybilgic A, Onel KB, Utset T, Alexander K, Wagner-Weiner L. Safety and immunogenicity of the quadrivalent HPV vaccine in female systemic lupus erythematosus patients aged 12 to 26 years. *Pediatric Rheumatol Online J [Internet].* 2013 [cited 2014 Jan 25];11:29. Available from: <<http://www.ped-rheum.com/content/pdf/1546-0096-11-29.pdf>>
- Liu HW, Lin HL, Yen JH, Tsai WC, Chiou SS, Chang JG, et al. Demethylation within the proximal promoter region of human estrogen receptor alpha gene correlates with its enhanced expression: implications for female bias in lupus. *Mol Immunol.* 2014;61(1):28-37.
- Tessier Cloutier B, Clarke AE, Ramsey-Goldman R, Wang Y, Foulkes W, Gordon C, et al. Breast cancer in systemic lupus erythematosus. *Oncology.* 2013;85(2):117-21.
- Colditz GA, Bohlke K, Berkey CS. Breast cancer risk accumulation starts early: prevention must also. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;145(3):567-79.
- Cecil DL, Park KH, Gad E, Childs JS, Higgins DM, Plymate SR, et al. T-helper I immunity, specific for the breast cancer antigen insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR), is associated with increased adiposity. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139(3):657-65.
- Sinicato NA, Postal M, Peres FA, Peliçari KO, Marini R, dos Santos AO, et al. Obesity and cytokines in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *J Immunol Res.* 2014;2014:162047.
- Bidgoli SA, Azarshab H. Role of vitamin D deficiency and lack of sun exposure in the incidence of premenopausal breast cancer: a case control study in Sabzevar, Iran. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(8):3391-6.
- Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(5):342-57.

CRISTIANE SANTOS SÂNZIO GURGEL¹
LARISSA QUEIROZ DE LIRA¹
GABRIELLE MAHARA AZEVEDO²
PRISCILA NUNES COSTA²
JANAINA OLIVEIRA ARAÚJO²
ROBERTO DIMENSTEIN³

Comparação entre a concentração sérica de alfa-tocoferol de puérperas assistidas em maternidades públicas e privadas no Nordeste do Brasil

Comparison between the serum concentration of alpha-tocopherol in puerperal women assisted in public and private maternities in Northeastern Brazil

Artigo Original

Palavras-chave

Alfa-Tocoferol
Hospitais públicos
Hospitais privados

Keywords

Alpha-Tocopherol
Hospitals, public
Hospitals, private

Resumo

OBJETIVO: Comparar a concentração de alfa-tocoferol no soro entre puérperas atendidas em maternidades das redes pública e privada da cidade de Natal (RN), Brasil. **MÉTODOS:** Participaram do estudo 209 puérperas, sendo 96 mulheres provenientes da rede privada e 113, da rede pública, entre 24 e 48 horas pós-parto. Foram incluídas no estudo parturientes com idade a partir de 12 anos, sem patologias associadas à gestação, que tiveram conceito único sem má-formação. Mulheres descompensadas clinicamente e com gestação múltipla foram excluídas. Amostras de 5 mL de sangue de cada participante foram coletadas no período de jejum, antes da primeira refeição do dia. A concentração de alfa-tocoferol no soro ($\mu\text{g}/\text{dL}$) foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A diferença estatística entre as médias foi testada utilizando o teste *t* de Student. **RESULTADOS:** As médias da concentração de alfa-tocoferol nas puérperas da rede pública e da rede privada, respectivamente, foram $1.115,7 \pm 341,4 \mu\text{g}/\text{dL}$ e $1.355,7 \pm 397,6 \mu\text{g}/\text{dL}$, tendo sido observada diferença estatisticamente significativa ($p=0,000687$). Para avaliação individual da concentração de vitamina E, a deficiência foi identificada quando alfa-tocoferol $<11,6 \mu\text{mol}/\text{L}$ ou $<499,6 \mu\text{g}/\text{dL}$. As puérperas da rede pública tiveram um percentual de 5,3% ($n=6$) de deficiência, enquanto nas participantes da rede privada tal carência não foi encontrada. Todavia, baixas concentrações (alfa-tocoferol entre $11,6-16,2 \mu\text{mol}/\text{L}$ ou $499,6-697,7 \mu\text{g}/\text{dL}$) ocorreram tanto na rede pública como na privada: 9,7% ($n=11$) e 4,2% ($n=4$), respectivamente. **CONCLUSÃO:** Esses resultados destacam que as mulheres assistidas no setor público foram mais vulneráveis a desenvolver baixas concentrações de alfa-tocoferol do que as mulheres assistidas no setor privado.

Abstract

PURPOSE: To compare the concentration of serum alpha-tocopherol during the postpartum period in women admitted to public and private hospitals in Natal (RN), Brazil. **METHODS:** The study included 209 women in the postpartum period, 96 of them from private hospitals and 113 from public hospitals, studied between 24 and 48 hours postpartum. Inclusion criteria were: mothers aged 12 years or more, without diseases associated with pregnancy, who had given birth to a singleton with no malformations. Clinically decompensated women with multiple fetuses were excluded. A 5 mL blood sample was obtained from each participant under fasting conditions, before the first meal of the day. The concentration of alpha-tocopherol in serum ($\mu\text{g}/\text{dL}$) was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The statistical difference between means was tested by the Student's *t* test. **RESULTS:** The mean concentration of alpha-tocopherol was $1.115.7 \mu\text{g}/\text{dL}$ in puerperae from the public network and $1.355.7 \pm 397.6 \mu\text{g}/\text{dL}$ in puerperae from the private network, with a significant difference between groups ($p=0.000687$). Vitamin E concentration was determined individually and an alpha-tocopherol level $<11.6 \mu\text{mol}/\text{L}$ or $<499.6 \mu\text{g}/\text{dL}$ was considered to indicate deficiency. Vitamin E deficiency was detected in 5.3% of puerperae from the public network ($n=6$), whereas no deficiency was detected among women from the private network. However, low concentrations of alpha-tocopherol (11.6 to $16.2 \mu\text{mol}/\text{L}$ or 499.6 to $697.7 \mu\text{g}/\text{dL}$) were detected in both groups, i.e., in 9.7% of the women from the public network ($n=11$) and in 4.2% for the women from the private network ($n=4$). **CONCLUSION:** These results highlight that women assisted in the public sector were more vulnerable to developing low concentrations of alpha-tocopherol than women assisted in the private sector.

Correspondência

Cristiane Santos Sânzio Gurgel
Avenida Senador Salgado Filho, 3.000 – Lagoa Nova
CEP: 59072-970
Natal (RN), Brasil

Recebido

23/04/2014

Aceito com modificações

11/07/2014

DOI: 10.1590/S0100-720320140005006

Laboratório de Bioquímica de Alimentos e Nutrição, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Rio Grande do Norte (RN), Brasil.

¹Doutorado em Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Natal (RN), Brasil.

²Programa de Mestrado em Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Natal (RN), Brasil.

³Departamento de Bioquímica, Laboratório de Bioquímica de Alimentos e Nutrição, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Natal (RN), Brasil.

Introdução

A manutenção da concentração plasmática de alfa-tocoferol adequada é necessária durante toda a vida. No entanto, é nos períodos gestacional e puerperal que essa demanda aumenta, sendo necessária a ingestão satisfatória de alimentos fontes de vitamina E ou alimentos fortificados e/ou suplementos, de maneira a atingir o requerimento nutricional que para essa vitamina corresponde à ingestão de alfa-tocoferol expressa em mg/dia¹.

De acordo com a *Dietary Reference Intakes* (DRI), mulheres grávidas e lactantes devem ingerir 15 e 19 mg/dia de alfa-tocoferol, respectivamente^{1,2}, porém essa ingestão dificilmente é atingida, uma vez que as fontes nutricionais mais importantes de vitamina E (alfa-tocoferol em mg), como os óleos e margarinas de girassol e gergelim, óleo de oliva extravirgem, nozes, amêndoas e castanha do Pará³, são itens dispendiosos para famílias economicamente desfavorecidas.

Segundo Sauberlich⁴, a deficiência de vitamina E em puérperas ocorre quando as concentrações plasmáticas de alfa-tocoferol estão abaixo de 11,6 µmol/L ou 499,6 µg/dL, e está relacionada com complicações maternas e/ou fetais, sobretudo nos recém-nascidos prematuros^{5,6}.

Estudos realizados em bases hospitalares públicas, no Brasil e no exterior, demonstraram concentrações séricas maternas satisfatórias para alfa-tocoferol⁷⁻⁹, detendo-se apenas aos serviços públicos de atendimento. Até o momento, não se conhece sobre as concentrações plasmáticas de vitamina E em mulheres assistidas nos setores privados do país, nem no exterior. No entanto, vale ressaltar que os usuários da rede pública nos países desenvolvidos¹⁰ nem sempre são de baixa renda; nesses locais, a adesão ao serviço público de saúde é uma escolha, e não a única opção viável. No Brasil, o sistema público é utilizado pela população de baixa renda; o privado, por indivíduos com poder aquisitivo maior e que, supostamente, possuem acesso aos alimentos mais ricos em vitamina E.

As gestantes atendidas nos setores privados normalmente são suplementadas durante a gestação com fórmulas polivitamínicas e poliminerais, recebendo ao longo da gestação doses diárias de alfa-tocoferol. Já as mulheres da rede pública são suplementadas com ácido fólico e ferro, seguindo a diretriz da Portaria nº 730, de 13 de maio de 2005¹¹, distribuídos na assistência pré-natal. As fórmulas polivitamínicas, pelo fato de serem dispendiosas, raramente são utilizadas por esse grupo de mulheres.

Tendo em vista a escassez de estudos que comparam o *status* de vitamina E de puérperas assistidas em maternidades públicas e privadas tanto no Brasil como no exterior, torna-se essencial obter um diagnóstico do estado nutricional em vitamina E dentro do contexto socioeconômico em que as puérperas estão inseridas. Este artigo comparou as concentrações de alfa-tocoferol sérico de

puérperas admitidas para o parto em maternidades das redes pública e privada da cidade de Natal (RN).

Métodos

O estudo foi de corte seccional descritivo realizado em puérperas assistidas em três maternidades do município de Natal: uma pública e duas privadas.

De um total de 18.201 partos realizados na cidade de Natal (RN) durante o período de 2009 a 2011, as maternidades estudadas contabilizaram, respectivamente, 3.911, 1.665 e 1.895 partos, o que representou 30,6, 11,1 e 13,3% do valor total.

O tamanho da amostra foi calculado em 200 participantes, sendo 100 de cada grupo (maternidade pública *versus* maternidades privadas). O cálculo foi realizado utilizando o pacote estatístico *G*Power V.3.1.7* e a aplicação do teste t bicaudal, no qual foram encontrados os seguintes parâmetros: valor α igual a 5%, poder esperado em 80% e o valor da medida de efeito igual a 0,40¹². O poder do teste também foi calculado, a fim de verificar se uma suposta diferença entre os grupos foi genuína ou sujeita a erro amostral. O número de mulheres elegíveis na maternidade na pública foi de 330, sendo 123 selecionadas, com perda de 8% (n=10). Nas unidades privadas, as mulheres elegíveis foram 356, sendo 108 selecionadas, com perda de 11,12% (n=12). O total de puérperas recrutadas nas maternidades foi 209, sendo 113 na pública e 96 nas privadas.

Os critérios de seleção das maternidades se deram por conveniência. A pesquisa obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (protocolo nº 479.073/2013). As parturientes recrutadas foram esclarecidas sobre os objetivos da pesquisa e autorizaram sua inclusão no estudo ao assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram selecionadas parturientes cujo parto tinha ocorrido havia, pelo menos, 48 horas, com idade a partir de 12 anos, sem patologias (diabetes, hipertensão, neoplasias, doenças do trato gastrointestinal e hepático, cardiopatias, infecciosas, sífilis, vírus da imunodeficiência humana – HIV – positivo), que tiveram concepto único sem má-formação. Os dados das pacientes foram obtidos após consulta ao prontuário hospitalar e por meio de entrevista.

Na maternidade pública, as puérperas foram admitidas para o estudo antes de serem medicadas com a megadose de vitamina A (2000.000 UI de retinol palmitato e 49,4 mg de all-rac-alfa-tocoferol), administrada como parte da rotina do pós-parto imediato, segundo a recomendação do Ministério da Saúde¹³.

As amostras de 5 mL de sangue das puérperas foram coletadas no período de jejum, antes da primeira refeição do dia, e imediatamente transportadas sob refrigeração ao

Laboratório de Pesquisa em Bioquímica da Nutrição, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), onde as alíquotas de sangue foram centrifugadas por 10 minutos (500 x g), para separação e remoção do soro, e posteriormente armazenadas a -20°C em tubo de polipropileno protegido da luz.

A técnica utilizada para a extração do tocoferol no soro foi adaptada de Ortega et al.¹⁴. Em 1 mL de soro, foi adicionada quantidade igual de etanol 95% (Merck, São Paulo, Brasil). As amostras foram homogeneizadas durante 1 min em agitador de tubos e, após isso, foram adicionados 2 mL de hexano Merck (São Paulo, Brasil), por três etapas de extração. Para cada etapa, repetiu-se a homogeneização e, posteriormente, as amostras foram centrifugadas (10 min, 500 x g). Da fase hexânica, foram separados 6 mL em tubo de polipropileno. Destes 6 mL, foram separados 3 mL da fase hexânica e evaporados em banho-maria a 37°C em atmosfera de nitrogênio. Para a aplicação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o estrato seco foi redissolvido em 500 µL de etanol absoluto Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), e 60 µL aplicados no aparelho.

As concentrações de alfa-tocoferol das amostras de soro foram determinadas por CLAE em cromatógrafo da marca Shimadzu (Shimadzu Corporation, Japão), com bomba LC-10 AD Shimadzu, acoplado a um Detector SPD-10A Shimadzu UV-VIS e integrador Chromatopac C-R6A Shimadzu, com uma coluna LC Perkin Elmer CLC-ODS (M) 4,6 mm x 25 cm. A fase móvel utilizada foi metanol a 100%, em sistema isocrático com fluxo de 1,0 mL/min e comprimento de onda de 292 nm.

Uma solução padrão contendo alfa-tocoferol SIGMA® (St. Louis, USA), com concentração confirmada pelo coeficiente de extinção específico em etanol absoluto, ϵ 1%, 1 cm=75,8 20, foi aplicada no CLAE previamente a todas análises. A identificação e a quantificação do alfa-tocoferol nas amostras foram estabelecidas por comparação da área do pico obtido no cromatograma com a área do respectivo padrão de alfa-tocoferol. O tempo de retenção para o alfa-tocoferol foi de 12,5 min.

Concentrações séricas de alfa-tocoferol inferiores a 11,6 µmol/L (499,6 µg/dL) foram consideradas indicativas de deficiência de vitamina E. Valores entre 11,6–16,2 µmol/L (499,6–697,7 µg/dL) indicaram baixas concentrações em vitamina E, e concentrações maiores que 16,2 µmol/L (697,7 µg/dL) foram consideradas aceitáveis⁴.

As análises estatísticas foram feitas utilizando o *software Statistica 7.0* (Soft, Inc., Tulsa, OK, USA). Os valores de alfa-tocoferol foram expressos em média e desvio padrão, tendo a normalidade da distribuição sido testada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. A comparação entre as médias foi feita utilizando o teste *t* de Student, com intervalo de confiança de 95% (IC95%) ($p=5\%$).

A prevalência foi estimada considerando as razões de prevalência (risco relativo – RR e *Odds Ratio* – OR), para a investigação de associações do estado nutricional em vitamina E (concentrações deficientes, baixas ou aceitáveis), segundo a rede de atendimento (pública *versus* privada). Foi considerado diferente estatisticamente quando $p<0,05$. Estando IC95% acima de 1, a exposição foi considerada um fator de risco¹⁵.

Resultados

As puérperas incluídas no estudo estavam na faixa etária entre 14 e 45 anos de idade. A cesariana foi a via de parto mais utilizada na rede privada, com 97% das mulheres; na rede pública, o parto vaginal prevaleceu em 94% dos nascimentos.

As médias da concentração de alfa-tocoferol nas puérperas da rede pública e da rede privada, respectivamente, foram 1.115,7±341,4 µg/dL e 1355,7±397,6 µg/dL, tendo sido observada diferença estatisticamente significativa ($p=0,000687$). O poder do teste aplicado para a amostra de 209 participantes (96 mulheres da rede privada e 113 da rede pública) foi 0,99, indicando que o resultado observado se configura como uma diferença genuína¹².

Na avaliação individual da concentração de vitamina E (concentração de alfa-tocoferol < 11,6 µmol/L ou 499,6 µg/dL foi considerada deficiente), as puérperas da rede pública tiveram um percentual de deficiência (5,3%; $n=6$), enquanto na rede privada tal carência não foi encontrada, resultando em RR=1,8 (IC95% 1,4–2,2; $p<0,0001$) e OR=11,7 (IC95% 0,7–209,9; $p=0,0956$). Todavia, baixas concentrações em vitamina E (alfa-tocoferol entre 11,6–16,2 µmol/L ou 499,6–697,7 µg/dL) ocorreram tanto na rede pública como na privada: 9,7% ($n=11$) e 4,2% ($n=4$), respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Razões de prevalência da associação da concentração sérica de alfa-tocoferol, segundo rede de atendimento (pública *versus* privada)

	Maternidades		RR (IC95%)	OR (IC95%)
	Pública (n=113)	Privada (n=96)		
Concentração de alfa-tocoferol (µg/dL)	1.115,7±341,4	1.355,7±397,6		
	n (%)	n (%)		
Deficiente (<499,6 µg/dL)	6 (5,3)	–	1,8 (1,4–2,2)* $p<0,0001$	11,7 (0,7–209,9) $p=0,0956$
Baixo (entre 499,6–697,7 µg/dL)	11 (9,7)	4 (4,2)	1,4 (0,9–1,9) $p=0,0503$	2,5 (0,8–8,1) $p=0,1309$
Aceitável (>697,7 µg/dL)	96 (85)	92 (95,8)	0,6 (0,5–0,8)* $p=0,003$	0,3 (0,1–0,8)* $p=0,0145$

*Diferença significativa.

RR: risco relativo; IC95%: intervalo de confiança de 95%; OR: *Odds Ratio*.

Discussão

Os grupos das redes pública e privada apresentaram médias da concentração sérica de alfa-tocoferol dentro dos parâmetros de adequação, baseadas nos valores de referência (alfa-tocoferol > 697,7 µg/dL). Concentrações semelhantes foram encontradas em estudos brasileiros e internacionais com população da rede pública^{7,16-20}. De acordo com a entrevista realizada, as gestantes atendidas na rede pública não utilizam fórmulas polivitamínicas durante o período gestacional. Em contrapartida, as gestantes atendidas nos setores privados foram suplementadas com polivitamínicos durante o último trimestre gestacional, e apresentaram a média de alfa-tocoferol sérico super ao grupo das não suplementadas.

Os resultados deste estudo condizem com o estudo de Bertoli et al.²¹, que realizaram uma pesquisa para avaliar o efeito da suplementação com vitamina E durante a gestação; os autores verificaram que o grupo suplementado com polivitamínicos contendo tocoferol na forma de acetato apresentou concentração de alfa-tocoferol plasmático maior do que o grupo não suplementado²¹.

Ortega et al.¹⁴, ao analisarem a concentração sérica de vitamina E em gestantes, observaram que mulheres que ingeriram vitamina E diariamente (proveniente da dieta e suplementos) atingiram mais de 75% da recomendação diária adequada desse composto (15 mg) e apresentaram média de alfa-tocoferol sérico maior do que o grupo não suplementado, apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa entre os grupos¹⁴.

É relatado que há, em diferentes populações, uma grande percentagem de inadequação quanto ao consumo de vitamina E, sendo encontrados grandes déficits de ingestão de tal substância, incluindo mulheres em idade fértil e gestantes (91,5% não atingem a recomendação diária)²², o que pode resultar em baixas concentrações no plasma.

A baixa concentração sérica de alfa-tocoferol nos períodos gestacional e puerperal pode ocasionar danos ao binômio mãe-filho. Pesquisas sugerem que um bom estado antioxidante exerce efeito protetor sobre o feto, tendo correlação com o crescimento intrauterino e o peso ao nascer, além de evitar o dano oxidativo ao DNA, às proteínas e aos lipídios^{5,23}. No estado puerperal, a concentração de alfa-tocoferol no soro materno pode influenciar a quantidade de vitamina E a ser secretada no leite humano. Dessa forma, a formação das reservas de vitamina E pelo recém-nascido é de extrema importância para a prevenção

de possíveis danos causados pelo estresse oxidativo que ocorre nos primeiros dias de vida⁷.

Os benefícios da suplementação com vitamina E vêm sendo atribuídos, por alguns autores, ao tratamento e à prevenção de pré-eclâmpsia²⁴, por sua atuação no desenvolvimento placentário e implantação do feto²⁵, bem como para a adequação dos níveis plasmáticos de alfa-tocoferol tanto no soro como colostro, quando a dieta for insuficiente^{26,27}. A correlação da concentração plasmática de alfa-tocoferol materno e sua influência na quantidade de vitamina E no leite humano foi comprovada na literatura. Garcia et al.²⁸ encontraram correlação positiva entre concentrações adequadas de alfa-tocoferol sérico e seu aumento no leite de transição ($r=0,456$; $p=0,009$), evidenciando a importância de um bom estado nutricional materno em vitamina E na composição do leite humano.

Com os resultados deste estudo foi possível observar que, embora tenha sido verificada uma adequação da média sérica de alfa-tocoferol nas mulheres não suplementadas da rede pública, 5,3% ($n=6$) delas apresentaram deficiência de vitamina E e 9,7% ($n=11$), baixas concentrações do nutriente (Tabela 1), condição que pode estar associada à ingestão insuficiente de alimentos fontes tocoferóis e/ou à ausência de suplementação.

A fim de minimizar a incidência da deficiência de vitamina E, assim como evitar baixas concentrações séricas que podem levar à deficiência, e considerando que naturalmente há uma redução gradual nos níveis séricos de alfa-tocoferol no final da gravidez e no início da lactação²⁸⁻³¹, bem como o aumento na demanda de alfa-tocoferol para o colostro³⁰, recomenda-se que, além de uma boa avaliação dietética e orientação nutricional, a suplementação de vitamina E no estado gestacional seja uma conduta realizada na assistência anterior e posterior ao parto.

Futuros trabalhos serão necessários para avaliar a concentração de alfa-tocoferol com suas variáveis relacionadas (consumo alimentar, composição química das fórmulas polivitamínicas, entre outras).

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pelo apoio financeiro e incentivo ao desenvolvimento da pesquisa, e a todas participantes e às maternidades coparticipantes (Hospital Geral Papi, Hospital Geral Promater e Maternidade Escola Januário Cicco), pela permissão para a realização do presente estudo.

Referências

- Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington (DC): National Academy Press; 2000.
- Batista ES, Costa AG, Pinheiro-Sant'ana HM. Adição da vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana. *Rev Nutr.* 2007;20(5):525-35.
- Traber MG. Vitamin E. In: Bowman BA, Russel RM, editors. Present knowledge in nutrition. Washington (DC): ILSI Press; 2007. p. 211-9.
- Sauberlich HE. Laboratory tests for the assessment of nutritional status. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 1999.
- Debier C. Vitamin E during pre- and postnatal periods. *Vitam Horm.* 2007;76:357-73.
- Brion LP, Bell EF, Raghuvver TS. Vitamin E supplementation for prevention of morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;(4):CD003665.
- Garcia L, Ribeiro K, Araújo K, Pires J, Azevedo G, Dimenstein R. Alpha-tocopherol concentration in the colostrum of nursing women supplemented with retinyl palmitate and alpha-tocopherol. *J Hum Nutr Diet.* 2010;23(5):529-34.
- Didenco S, Gillingham MB, Go MD, Leonard SW, Traber MG, McEvoy CT. Increased vitamin E intake is associated with higher alpha-tocopherol concentration in the maternal circulation but higher alpha-carboxy ethyl hydroxychroman concentration in the fetal circulation. *Am J Clin Nutr.* 2011;93(2):368-73.
- Schulpis KH, Michalakakou K, Gavriili S, Karikas GA, Lazaropoulou C, Vlachos G, et al. Maternal-neonatal retinol and alpha-tocopherol serum concentrations in Greeks and Albanians. *Acta Paediatr.* 2004;93(8):1075-80.
- Antonakou A, Chiou A, Andrikopoulos NK, Bakoula C, Matalas AL. Breast milk tocopherol content during the first six months in exclusively breastfeeding Greek women. *Eur J Nutr.* 2011;50(3):195-202.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n° 730, de 13 de maio de 2005. Institui o Programa Nacional de Suplementação de Ferro, destinado a prevenir a anemia ferropriva e dá outras providências. Brasília: Diário Oficial da União; 2005.
- Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods.* 2007;39(2):175-91.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Vitamina A mais: programa nacional de suplementação de vitamina A - condutas gerais. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.
- Ortega RM, López-Sobaler AM, Martínez RM, Andrés P, Quintas ME. Influence of smoking on vitamin E status during the third trimester of pregnancy and on breast-milk tocopherol concentrations in Spanish women. *Am J Clin Nutr.* 1998;68(3):662-7.
- Sheskin DJ. Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. 3rd ed. Boca Raton: Chapman & Hall/RC; 2004.
- Dimenstein R, Pires JF, Garcia LR, Lira LQ. [Levels of alpha-tocopherol in maternal serum and colostrum of adolescents and adults]. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2010;32(6):267-72. Portuguese.
- Dimenstein R, Medeiros AC, Cunha LR, Araújo KF, Dantas JC, Macedo TM, et al. Vitamin E in serum and human colostrum under fasting and postprandial conditions. *J Pediatr (Rio J).* 2010;86(4):345-8.
- de Lira LQ, Lima MS, de Medeiros JM, da Silva IF, Dimenstein R. Correlation of vitamin A nutritional status on alpha-tocopherol in the colostrum of lactating women. *Matern Child Nutr.* 2013;9(1):31-40.
- Papas A, Stacewicz-Sapuntzakis M, Lagiou P, Bamia C, Chloptsios Y, Trichopoulou A. Plasma retinol and tocopherol levels in relation to demographic, lifestyle and nutritional factors of plant origin in Greece. *Br J Nutr.* 2003;89(1):83-7.
- Pita Rodríguez G, Pineda Alonso D, Serrano Sintes G, Macías Matos C, Cabrera Hernández A, Rodríguez Enríquez Y, et al. Vitaminas antioxidantes em un grupo de embarazadas y recién nacidos durante un año de estudio. *Rev Cuba Aliment Nutr.* 2002;16(2):58-94.
- Bertoli CJ, Leone C, Junqueira VB. Concentração de micronutrientes em mães e seus recém-nascidos por ocasião do parto. *Rev Bras Crescimento Desenvolv Hum.* 2010;20(2):270-81.
- Moshfegh A, Goldman J, Cleveland L. What we eat in America: NHANES 2001–2002: usual nutrient intakes from food compared to dietary reference intakes. Washington (DC): U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service; 2005.
- Scholl TO, Leskiw M, Chen X, Sims M, Stein TP. Oxidative stress, diet, and the etiology of preeclampsia. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(6):1390-6.
- Hovdenak N, Haram K. Influence of mineral and vitamin supplements on pregnancy outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;164(2):127-32.
- Gagné A, Wei SQ, Fraser WD, Julien P. Absorption, transport, and bioavailability of vitamin E and its role in pregnant women. *J Obstet Gynaecol Can.* 2000;31(3):210-7.
- Debier C, Larondelle Y. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *Br J Nutr.* 2005;93(2):153-74.
- Malta MB, Carvalhaes MA, Parada CM, Corrente JE. Utilização das recomendações de nutrientes para estimar prevalência de consumo das vitaminas C e E em gestantes. *Rev Bras Epidemiol.* 2008;11(4):573-83.
- Garcia LR, Ribeiro KD, Araújo KF, Azevedo GM, Pires JF, Batista SD, et al. Níveis de alfa-tocoferol no soro e leite materno de puérperas atendidas em maternidade pública de Natal, Rio Grande do Norte. *Rev Bras Saude Matern Infant.* 2009;9(4):423-8.
- Debier C, Pomeroy PP, Baret PV, Mignolet E, Larondelle Y. Vitamin E status and the dynamics of its transfer between mother and pup during lactation in grey seals (*Halichoerus grypus*). *Can J Zool.* 2002;80(4):727-37.
- Gay LS, Kronfeld DS, Grimsley-Cook A, Dascanio JJ, Ordakowski-Burk AO, Splan RK, et al. Retinol, beta-carotene and beta-tocopherol concentrations in mare and foal plasma and in colostrums. *J Equine Vet Sci.* 2004;24(3):115-20.
- Lauridsen C, Engel H, Jensen SK, Craig AM, Traber MG. Lactating sows and suckling piglets preferentially incorporate RRR- over all-rac-alpha-tocopherol into milk, plasma and tissues. *J Nutr.* 2002;132(6):1258-64.

MARIANA MOURAZ LOPES DOS SANTOS¹
SARA MARQUES SOARES PROENÇA¹
MARIA INÊS NUNES PEREIRA DE ALMEIDA REIS¹
RUI MIGUEL ALMEIDA LOPES VIANA¹
LUIA MARIA BERNARDO MARTINS¹
JOÃO MANUEL DOS REIS COLAÇO¹
FILOMENA MARIA PINHEIRO NUNES¹

Spontaneous rupture of renal angiomyolipoma during pregnancy

Rotura espontânea de um angiomiolipoma durante a gravidez

Case Report

Keywords

Angiomyolipoma/complications
Angiomyolipoma/diagnosis
Pregnancy complications, neoplastic
Rupture, spontaneous
Case reports

Palavras-chave

Angiomiolipoma/complicações
Angiomiolipoma/diagnóstico
Complicações neoplásicas na gravidez
Ruptura espontânea
Relatos de casos

Abstract

Renal angiomyolipoma is a benign tumor, composed of adipocytes, smooth muscle cells and blood vessels. The association with pregnancy is rare and related with an increased risk of complications, including rupture with massive retroperitoneal hemorrhage. The follow-up is controversial because of the lack of known cases, but the priorities are: timely diagnosis in urgent cases and a conservative treatment when possible. The mode of delivery is not consensual and should be individualized to each case. We report a case of a pregnant woman with 18 weeks of gestation admitted in the emergency room with an acute right low back pain with no other symptoms. The diagnosis of rupture of renal angiomyolipoma was established by ultrasound and, due to hemodynamically stability, conservative treatment with imaging and clinical monitoring was chosen. At 35 weeks of gestation, it was performed elective cesarean section without complications for both mother and fetus.

Resumo

O angiomiolipoma é um tumor benigno, constituído por adipócitos, células de músculo liso e vasos sanguíneos. Sua associação com a gravidez é rara e está relacionada com um aumento de complicações, nomeadamente rotura com hemorragia retroperitoneal maciça. O *follow-up* é controverso em razão do escasso número de casos descritos, no entanto as prioridades são: diagnóstico atempado nas situações urgentes e, sempre que possível, tratamento conservador. O tipo de parto não é consensual e deve ser individualizado caso a caso. Relatamos um caso de uma grávida com 18 semanas de gestação que recorreu ao serviço de urgência por lombalgia direita aguda, sem outros sintomas relevantes. Diagnosticou-se ecograficamente rotura de angiomiolipoma renal e, em decorrência da estabilidade hemodinâmica do quadro, procedeu-se ao tratamento conservador com monitorização imagiológica e clínica. Às 35 semanas de gestação, realizou-se uma cesariana eletiva que decorreu sem complicações maternas ou fetais.

Correspondence

Mariana Mouraz Lopes dos Santos
Avenida Brigadeiro Victor Novais Gonçalves, 2755-009 – Alcabideche
Cascais, Portugal

Received

07/05/2014

Accepted with modifications

07/07/2014

DOI: 10.1590/S0100-720320140005019

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital Dr. José de Almeida – Cascais, Portugal.
Conflict of interests: none.

Introduction

The angiomyolipoma (AML) is often a benign tumor consisting of three types of histologic features: adipocytes, smooth muscle cells and blood vessels with thickened wall¹⁻³. The incidence of renal AML is 0.3% in the general population and represents 3% of solid renal masses¹⁻⁴, being even more infrequent during pregnancy^{1,4-6}. There are two known types of AML: the isolated angiomyolipoma, which represents 80% of cases, and the one associated with tuberous sclerosis (TS)^{1,7,8}. In the first case, these masses are usually solitary, large and asymptomatic, and the mean age of diagnosis is 43 years^{1,4,7}. When associated with TS are often multiple, bilateral and small, and hemorrhage is frequent⁸. The diagnosis is made at earlier ages, 20–30 years^{1,2,8}. As in most cases there are no symptomatic manifestations^{1,2}, the AMLs are often diagnosed as incidentalomas^{1,4}, however they may be related to severe symptoms⁹⁻¹².

The risk of spontaneous rupture associated with pregnancy is higher and can be catastrophic^{5,7}. A conservative approach, with preservation of renal function by selective embolization or partial nephrectomy, is possible and preferable in most patients^{2,4,5,13}.

Case report

TM, 40 years old, gesta 3, para 2, current pregnancy through in vitro fertilization, had two transverse segmental cesarean sections in 2000 and 2003. Patient had no relevant family history.

The pregnancy proceeded without complications until 18 weeks of gestation, when appeared a low back pain radiating to right upper abdominal quadrant, with no other associated symptoms. On physical and analytical examination, it was found a positive renal Murphy sign, microscopic hematuria, hemoglobin of 10.8 mg/dL and 5.82 mg/dL of C-reactive protein. In the ultrasound, a 5 cm nodular lesion in the right kidney was detected, what suggests anhyperechoic, heterogeneous AML, consistent with probable hemorrhage (Figure 1). The patient underwent only conservative measures, and the bleeding stopped spontaneously. Two months after the first ultrasound, a magnetic resonance imaging (MRI) was performed and there was no evidence of increasing (Figure 2). Regularity of the pain, which was frequent and progressively worsening, breech presentation and two previous cesarean-scars led to schedule a cesarean section for 35 weeks. The surgery was performed without any complications. Surgeons opted for a non exhaustive exploration of the retroperitoneal space due to the risk of rupture associated with handling. The 1- and 5-minute ApgarApgar was 9 and 10, respectively, and the immediate

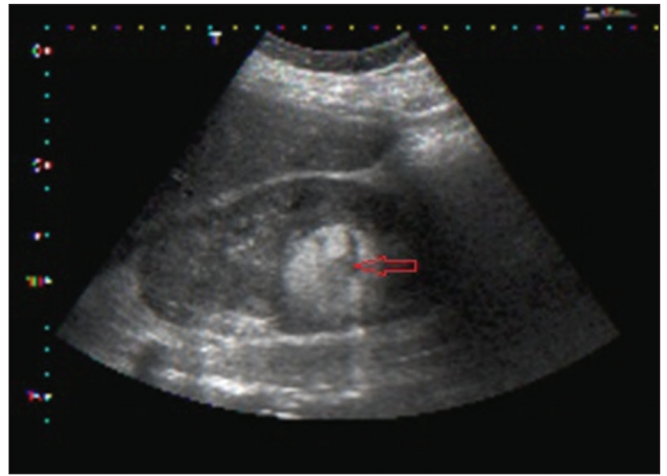


Figure 1. Renal ultrasound, nodular lesion with 5 cm suggestive of angiomyolipoma

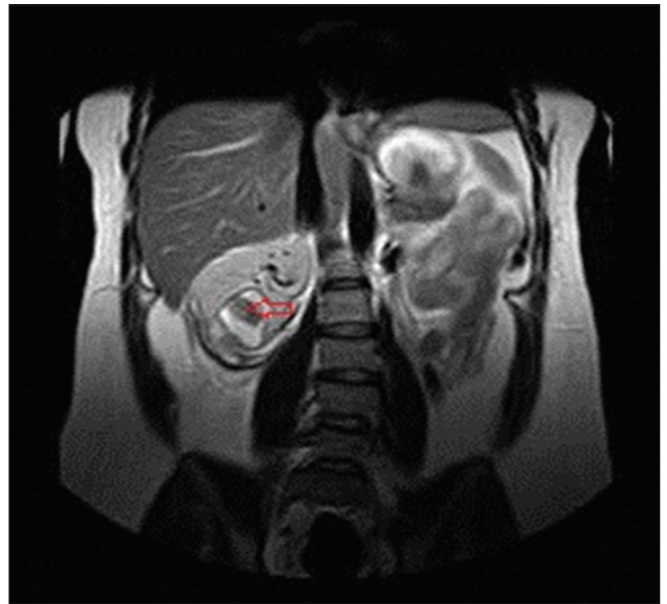


Figure 2. Abdominal magnetic resonance imaging, nodular lesion with 5 cm with hemorrhagic material and subcapsular hematoma

post-partum period went linear. The patient refused any surgical treatment and imaging follow-up postpartum.

Discussion

The AMLs are uncommon tumors^{14,15}. They were first described in 1951 by Morgan et al.^{3,7,14}. Most of these tumors appear in the kidney (renal parenchyma), however these can be found in other locations, such as the spleen, liver, uterus and fallopian tubes¹⁴.

About 20% of the cases are associated with tuberous sclerosis, which is an autosomal dominant disease, rare, characterized by the growth of benign tumors in multiple organs (kidney, brain, heart, lungs and skin)¹⁶⁻¹⁸. Signs and symptoms depend on the affected organ and may have

multiple levels of severity¹⁹. AMLs occur in 80% of the patients with TS^{4,8,14,18-21}. The majority of the cases occur at earlier ages, present bilateral distribution, are usually multiple, small (<2 cm), benign and asymptomatic^{4,7,14}. These tend to grow faster when compared to the isolated type and often require earlier surgical treatment^{3,4,7,14}. In cases that arise isolated, the tumor is usually single, unilateral, asymptomatic, appears later in life^{4,14}, grows slowly and has better outcomes⁷.

These tumors are usually asymptomatic, but can manifest as a flank pain, palpable abdominal mass, hematuria, nausea and vomiting^{1,3,14,20}. In 10% of the cases, they manifest as hypovolemic shock resulting from massive retroperitoneal bleeding, known as Wunderlich syndrome^{1-3,14,21-23}. The risk factors associated with the spontaneous rupture and perirenal or intratumoral bleeding, include: association with TS, signs and symptoms, a bigger size (> 4 cm) and pregnancy¹⁴. The main causes in pregnancy are increased growth rate, blood volume and renal blood flow^{4,14,20}. The greater growth during pregnancy, the predominance in women in childbearing age and the rarity before puberty suggest clear hormone dependence^{4,5,14,20}.

Ultrasonographically, the tumor presents a hyperechoic mass with great vascularity — existence of arteriovenous shunts (turbulent pulsating flows)¹⁴. Computed tomography (CT) is the gold standard exam because it detects fat in the tumor⁷ — highly suggestive of AML^{3,11}. MRI can also differentiate fat by its high signal intensity and is a complementary exam currently used when CT is contraindicated and when lesions are small or complex^{14,16}.

The main differential diagnosis must be established with renal cell carcinoma¹⁴. Other causes of retroperitoneal bleeding are: spontaneous rupture of kidney with hidronefrosis, spontaneous rupture of aneurysm or renal vessels and other vascular accidents^{9,14,20}.

The follow-up of these patients is highly controversial and debatable due to the lack of known cases^{1,4,14}; however, in most situations, it is used an algorithm proposed

by Oesterling, based on clinical, bilaterally and tumor size^{4,14}. Asymptomatic tumors should be controlled with ultrasound or CT every six months if they are greater than 4 cm and once a year if they are smaller^{1,4,9,14}. In symptomatic cases or with bilateral lesions, the choice should be selective arterial embolization or conservative renal surgery (lumpectomy or partial nephrectomy)^{1,4,14,21,24-27}. Radical nephrectomy is performed in cases of urgency, with uncontrollable bleeding and hemodynamic instability, large tumor size, central location or coexisting carcinoma^{1,14,25}. The rupture during pregnancy, in many instances, requires an urgent laparotomy in order to control bleeding, by nephrectomy¹⁴. Some authors recommend fetal extraction by cesarean section in the same surgical procedure in pregnancies at 28 gestational weeks or more¹⁴.

In our case, due to the hemodynamic stability and spontaneous cessation of bleeding it was decided to perform an expectant procedure, even though the tumor size was greater than 4 cm.

As we have seen, it appears that these tumors have a higher growth rate in pregnancy, and the question that often arises is about the best time to perform surgery^{1,4}. If there is an absolute necessity to perform surgery, the second trimester of pregnancy is chosen for the following reasons: surgery during the first trimester may increase the rate of abortions and fetal malformations, and in the third trimester there are more technical difficulties and the risk of pre-term delivery increases^{1,4,14}.

The delivery mode should be discussed case by case, depending on the coexistence of the associated factors^{14,28}. Although it seemed that the variations in blood pressure during labor and Valsalva maneuvers could increase the risk of potentially fatal bleeding, there are no evidences that prove a higher incidence of bleeding during a vaginal delivery when compared to the cesarean procedure¹⁴.

In conclusion, we have to individualize each case, but always keep in mind the priorities: on-time diagnosis in urgent cases and the most conservative treatment as possible.

References

1. Kontos S, Politis V, Fokitis I, Lefakis G, Koritsiadis G, Simaioforidis V, et al. Rupture of renal angiomyolipoma during pregnancy: a case report. *Cases J*. 2008;1(1):245.
2. Pereira S, Martinho D, Rodrigues R, Melo M, Mendonça T, Romão A, et al. Rotura espontânea de angiomiolipomarenal. *ActaUrol*. 2009;26(2):118.
3. Pinto AC, Campos RSM, Pereira DA, Gomes GC, Carnevale FC, Pinto AFC. [Renal angiomyolipomarrupture: case report]. *Einstein (São Paulo)*. 2006;4(1):25-6. Portuguese.
4. Gimeno Argente V, Bosquet Sanz M, Bonillo García MA, Gómez Pérez L, Pontones Moreno JL, Jiménez Cruz JF. Cirugía conservadora del angiomiolipoma renal bilateral durante el embarazo. *Actas Urol Esp*. 2006;30(6):633-7.
5. Zapardiel I, Delafuente-Valero J, Bajo-Arenas JM. Renal angiomyolipoma during pregnancy: review of the literature. *Gynecol Obstet Invest*. 2011;72(4):217-9.

6. Peces R, Cuesta-López E, Peces C, Selgas R. Giant bilateral renal angiomyolipomas and lymphangiomyomatosis presenting after two successive pregnancies successfully treated with surgery and rapamycin. *Scientific World Journal*. 2011;11:2115-23.
7. Lim CH, Mulvin D. Embolisation of bleeding renal angiomyolipoma in pregnancy. *Open J Urol*. 2011;1(3):25-7.
8. Ferianec V, Gábor M, Caño M, Papcun P, Holomáň K. Severe retroperitoneal haemorrhage in the first trimester of a multiple pregnancy after spontaneous rupture of renal angiomyolipoma. *Arch Gynecol Obstet*. 2013;288(6):1193-4.
9. Lu CY, Min PQ, Wu B. CT evaluation of spontaneously ruptured renal angiomyolipomas with massive hemorrhage spreading into multi-retroperitoneal fascia and fascial spaces. *Acta Radiol Short Rep*. 2012;1(4):arsr.2012.110009.
10. Wang HB, Yeh CL, Hsu KF. Spontaneous rupture renal angiomyolipoma with hemorrhagic shock. *Intern Med*. 2009;48(12):1111-2.
11. Cifuentes M, Calleja F, Hola J, Daviú A, Jara D, Vallejos H. [Renal angiomyolipoma rupture as a cause of lumbar pain: report of one case]. *Rev Med Chil*. 2008;136(8):1031-3. Spanish.
12. Unlü C, Lamme B, Nass P, Bolhuis HW. Retroperitoneal haemorrhage caused by a renal angiomyolipoma. *Emerg Med J*. 2006;23(6):464-5.
13. Shen WH, Pan JH, Yan JN, Chen ZW, Zhou ZS, Lu GS, et al. Resection of a giant renal angiomyolipoma in a solitary kidney with preoperative arterial embolization. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(9):1435-7.
14. Illescas Molina T, Montalvo Montes J, Contreras Cecilia E, Muñoz Muñoz M, González González A, Herraiz Martínez M. Angiomiolipomas, esclerosis tuberosa y gestación: caso clínico. *Ginecol Obstet Mex*. 2009;77(8):380-6.
15. Itano S, Sakai T, Ijuin H, Koga K, Yoshiyama Y, Yoshida T, et al. Three cases of renal angiomyolipoma. *Intern Med*. 1997;36(3):206-10.
16. Bigelow D, Folio L. Radiology corner. Angiomyolipoma. *Mil Med*. 2008;173(1):xiii-xiv.
17. Schneider-Monteiro ED, Lucon AM, de Figueiredo AA, Rodrigues Junior AJ, Arap S. Bilateral giant renal angiomyolipoma associated with hepatic lipoma in a patient with tuberous sclerosis. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2003;58(2):103-8.
18. Kodama K, Takase Y, Motoi I. Management of a renal calculus larger than 4 cm in a patient with tuberous sclerosis complex-associated angiomyolipoma. *Indian J Urol*. 2012;28(4):442-4.
19. Prando A. Renal angiomyolipoma: relationships between tumor size, aneurysm formation, and rupture. *Int Braz J Urol*. 2002;28(6):578-9.
20. Lewis EL, Palmer JM. Renal angiomyolipoma and massive retroperitoneal hemorrhage during pregnancy. *West J Med*. 1985;143(5):675-6.
21. Lee SY, Wang LJ, Yen TH, Chang CT. Transarterial embolization of ruptured angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(8):1762-3.
22. Sparks D, Chase D, Thomas D, Arnott J. The Wunderlich's syndrome secondary to massive bilateral angiomyolipomas associated with advanced tuberous sclerosis. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2011;22(3):534-7.
23. Medda M, Picozzi SC, Bozzini G, Carmignani L. Wunderlich's syndrome and hemorrhagic shock. *J Emerg Trauma Shock*. 2009;2(3):203-5.
24. Koo KC, Kim WT, Ham WS, Lee JS, Ju HJ, Choi YD. Trends of presentation and clinical outcome of treated renal angiomyolipoma. *Yonsei Med J*. 2010;51(5):728-34.
25. Kellner DS, Ercolani MC, Isom-Batz G, Javit DJ, Armenakas NA. Renal angiomyolipoma presenting with massive retroperitoneal hemorrhage. *Hosp Physician*. 2004;40(12):34-6.
26. Idilman IS, Vesnic S, Cil B, Peynircioglu B. Giant renal artery pseudoaneurysm caused by rupture of renal angiomyolipoma following pregnancy: endovascular treatment and review of the literature. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2014;25(2):385-9.
27. Shah J, Jones J, Miller MA, Patel U, Anson KM. Selective embolization of bleeding renal angiomyolipoma in pregnancy. *J R Soc Med*. 1999;92(8):414-5.
28. Tanaka M, Kyo S, Inoue M, Kojima T. Conservative management and vaginal delivery following ruptured renal angiomyolipoma. *Obstet Gynecol*. 2001;98(5 Pt 2):932-3.

Expressão proteica do gene HOXA10 e dos receptores de estrogênio e progesterona no epitélio, estroma e tecido muscular liso perilesional de endometriose do reto-sigmoide

HOXA10 as well as estrogen and progesterone receptor protein expression in the epithelium, stroma, and adjacent smooth muscle of rectosigmoid endometriosis

Resumo de Tese

Palavras-chave

Gene HOXA10
Endometriose profunda
Endometriose de reto-sigmoide
Receptor de estrogênio α
Receptor de estrogênio β
Receptor de progesterona
Receptor de progesterona B

Keywords

HOXA10 gene
Profound endometriosis
Endometriosis of the sigmoid colon-rectum
Estrogen receptor α
Estrogen receptor β
Progesterone receptor
Progesterone receptor B

DOI: 10.1590/S0100-72032014T0002

Tese apresentada junto ao Departamento de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo/SP, em 23 de julho de 2013.

INTRODUÇÃO: A patogênese da endometriose profunda (EPF) é incerta. O fator de transcrição *homeobox A10* (HOXA10) regula a conferência de identidade tecidual de útero ao ducto paramesonéfrico indiferenciado. HOXA10 é expresso em endometriose ovariana, peritoneal, pulmonar e reto-vaginal, relacionando-o à patogênese da endometriose. Estradiol e progesterona ativam a transcrição do gene HOXA10. Nesse estudo, avaliamos a expressão proteica de HOXA10, das isoformas α (ER- α) e β (ER- β) dos receptores de estrogênio, e do receptor de progesterona AB (PR-AB) e sua isoforma B (PR-B) na lesão (LES) e no tecido muscular liso perilesional (TMLP) de endometriose de reto-sigmoide (ERS), durante as fases proliferativa e secretora do ciclo. **MÉTODOS:** Amostras de LES e TMLP de ERS de 18 pacientes (9 operadas em cada fase) foram agrupadas em blocos de microarranjos de tecidos (*tissue microarray*). Após preparação imunoistoquímica, avaliamos as amostras por microscopia ótica (MO) e por um *software* específico, a análise morfométrica (AM). **RESULTADOS:** HOXA10 foi expresso no estroma de LES de ERS durante a fase secretora. ER- α e ER- β foram expressos em glândulas e estroma de LES e TMLP de ERS durante ambas as fases do ciclo. PR-AB e PR-B foram expressos em glândulas e estroma de LES de ERS durante ambas as fases do ciclo. A expressão de HOXA10 correlacionou-se diretamente com PR-AB e PR-B na ERS. Não houve correlação entre ER- α e ER- β com HOXA10, PR-AB ou PR-B em nenhuma fase do ciclo ou local de expressão de ERS. **CONCLUSÕES:** HOXA10 é expresso em ERS, fora do seu eixo espacial de expressão. HOXA10 pode ser necessário para conferir a identidade "de novo" na EPF, incluindo ERS, favorecendo a hipótese da origem embrionária da doença. A progesterona pode ativar o gene HOXA10 e regular esta ação, possivelmente mediada por PR-B. A ação mitógena do estradiol na ERS é mediada por ER- α e ER- β .

2014

SETEMBRO

4 a 6 de Setembro de 2014

XIX Congresso Paulista de Obstetrícia e Ginecologia
do Estado de São Paulo

Realização: SOGESP

Local: Transamérica Expo Center – São Paulo (SP)

Informações: www.sogesp.org.br

OUTUBRO

23 a 25 de Outubro de 2014

20º Congresso Baiano de Obstetrícia e Ginecologia

Realização: SOGIBA

Local: Hotel Pestana – Salvador (BA)

Informações: www.abmeventos.org.br/evento/xx-congresso-baiano-de-ginecologia-e-obstetricia/index.html

NOVEMBRO

20 a 22 de Novembro de 2014

28º Congresso Nordestino de Obstetrícia e Ginecologia
e IX Congresso Sergipano de Ginecologia e Obstetrícia

Local: Prodigy Beach Resort & Conventions
Aracaju – Aracaju (SE)

E-mail: sogise@sogise.com.br

Informações: www.sogise.com.br/congresso/

Teste rápido para diagnóstico de Vaginose Bacteriana.



Kolplast ci Ltda.

Diagnosit[®] BVBLUE[®]

Prático, preciso é Point-of-care!

www.kolplast.com.br | vendas@kolplast.com.br | Tel. (11) 4961-0924

4 a 6 de setembro de 2014



***XIX Congresso Paulista de
Obstetrícia e Ginecologia do
Estado de São Paulo***

Local: Transamérica Expo Center — São Paulo (SP)

Realização: SOGESP

Informações www.sogesp.org.br

Chegou

Araceli desogestrel

Livre de estrogênio¹

O novo contraceptivo
da Medley.

Segurança: mais seguro que os AHCOs para hipertensas, diabéticas e tabagistas, inclusive maiores de 35 anos.²

Eficácia: mesma eficácia dos AHCOs sem os eventos adversos do estrógeno.³⁻⁵

Pode ser utilizado por pacientes: lactantes, com enxaqueca, TPM e endometriose.^{2,3,6-9}

medicamento de marca mais acessível do mercado
25%
mais acessível que o de referência¹⁰



Serviço de Informações Medley
0800 7298000
www.medley.com.br

Referências: 1. Bula do produto. 2. Nappi RE, Merki-Feld GS, Terreno E, Pellegrinelli A, Viana M. Hormonal contraception in women with migraine: is progesterone-only contraception a better choice? J Headache Pain. 2013; 14: 66. 3. Ahrendt HJ, Adolf D, Buhling KJ. Advantages and challenges of oestrogen-free hormonal contraception. Curr Med Res Opin. 2010; 26 (8): 1947-55. 4. Milsom I, Korver T. Ovulation incidence with oral contraceptives: a literature review. J Fam Plann Reprod Health Care. 2008; 34 (4): 237-46. 5. Korver T, Klipping C, Heger-Mahn D, Duijkers I, van Osta G, Dieben T. Maintenance of ovulation inhibition with the 75-microg desogestrel-only pill (Cerazette) after scheduled 12-h delays in tablet intake. Contraception. 2005; 71 (1): 8-13. 6. Bjarnadóttir H, Gottfredsdóttir K, Geirsson RT, Dieben TO. Comparative study of the effects of a progesterone-only pill containing desogestrel and an intrauterine contraceptive device in lactating women. BJOG. 2001; 108 (11): 1174-80. 7. Ahrendt HJ, Apetauer I. Improvement of oestrogen-related symptoms with a desogestrel-only contraceptive among women who experienced oestrogen-related symptoms using combined oral contraceptives. Disponível em: http://www.prof-ahrendt-frauenarzt.de/weiterbildung/Publikationen/Estrogen_Related-Symptoms2008.pdf. Acesso em 16/07/2014. 8. Leone Roberti Maggiore U, Remorgida V, Scala C, Tafi E, Venturini PL, Ferrero S. Desogestrel-only contraceptive pill versus sequential contraceptive vaginal ring in the treatment of rectovaginal endometriosis infiltrating the rectum: a prospective open-label comparative study. Acta Obstet Gynecol Scand. 2014 Mar;93(3):239-47. 9. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Treatment of pelvic pain associated with endometriosis: a committee opinion. Fertil Steril. 2014; 101 (4): 927-35. 10. Revista ABCFARMA. Julho/2014 | Araceli é mais acessível que Nactali®, Juliet® e 25% mais acessível que a apresentação de 1 ciclo de Cerazette®.

Medley.

UMA EMPRESA SANOFI

Araceli - desogestrel. Indicação: anticoncepção. **Contraindicações:** hipersensibilidade à substância ativa ou a quaisquer dos excipientes, distúrbio tromboembólico venoso ativo, presença ou história de doença hepática grave, enquanto os valores dos testes de função hepática não retornarem ao normal, doença maligna sensível a esteroides sexuais conhecida ou suspeita, sangramento vaginal não diagnosticado, mulheres grávidas ou que suspeitam de gravidez. **Precauções e Advertências:** deve-se avaliar a relação risco/benefício na mulher com câncer hepático. Deve ser descontinuado em caso de trombose, imobilização prolongada devido à cirurgia ou doença. Mulheres com história de distúrbios tromboembólicos devem ser alertadas sobre a possibilidade de recorrência. Pacientes diabéticas devem ser observadas durante os primeiros meses de uso. Mulheres com tendência a cloasma devem evitar exposição ao sol ou à radiação ultravioleta. Contém lactose, não deve ser administrado em pacientes com o raro problema hereditário de intolerância à galactose, à deficiência de lactase Lapp ou à má absorção de glicose-galactose. O desenvolvimento folicular ocorre e, ocasionalmente, o folículo pode continuar a se desenvolver além do tamanho que poderia atingir num ciclo normal. Pode ser administrado durante a lactação. **Interações Medicamentosas:** fenitoína, fenobarbital, primidona, carbamazepina, rifampicina, oxcarbazepina, rifabutina, topiramato, felbamato, ritonavir, nelfinavir, griseofulvina, produtos fitoterápicos contendo *Hypericum perforatum* (erva de São João ou St. John's wort), carvão medicinal, ciclosporina. **Reações adversas:** alteração de humor, diminuição da libido, cefaleia, náusea, acne, dor nas mamas, menstruação irregular, amenorreia, aumento de peso, secreções mamárias. **Posologia:** deve-se tomar um comprimido ao dia durante 28 dias consecutivos. Cada cartela subsequente deve ser iniciada imediatamente após o término da anterior. USO ADULTO. **Registro MS:** 1.0181.0644. **VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA.** SE PERSISTIREM OS SINTOMAS, O MÉDICO DEVERÁ SER CONSULTADO.

©Medley 2014 © Marca Registrada. ARACELI ANUNCIO MEDICO - 50519488 - Julho/2014 - Material destinado aos profissionais de saúde habilitados a prescrever ou dispensar medicamentos.

23 a 25 de outubro de 2014

**20° Congresso Baiano de
Obstetrícia e Ginecologia**

Local: Hotel Pestana — Salvador (BA)

Realização: SOGIBA

Informações [www.abmeventos.org.br/evento/
xx-congresso-baiano-de-ginecologia-e-obstetricia/index.html](http://www.abmeventos.org.br/evento/xx-congresso-baiano-de-ginecologia-e-obstetricia/index.html)