

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde
Área de Concentração em Clínica Médica
Tese de Doutorado

EXPRESSÃO DA ENZIMA SIRT 1, p 53 E RECEPTORES HORMONAIS
(RE / RP) NO ENDOMÉTRIO NEOPLÁSICO E SADIO

Chrystiane da Silva Marc

Porto Alegre
2015

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde
Área de Concentração em Clínica Médica
Tese de doutorado

EXPRESSÃO DA ENZIMA SIRT 1, p 53 E RECEPTORES HORMONAIS
(RE / RP) NO ENDOMÉTRIO NEOPLÁSICO E SADIO

Aluna: Chrystiane da Silva Marc

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Duval da Silva

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Área de Concentração em Clínica Médica, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, para obtenção do título doutor em Medicina.

Porto Alegre
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

M313e Marc, Chrystiane da Silva

Expressão da enzima SIRT 1, p 53 e receptores hormonais (RE / RP) no endométrio neoplásico e sadio / Chrystiane da Silva Marc. Porto Alegre: PUCRS, 2015.

74f.: il.: tab.

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Duval da Silva.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica Médica.

1. CÂNCER DE ENDOMÉTRIO. 2. SIRT1. 3. HISTONAS DESACETILASES. 4. RECEPTORES HORMONAIIS. 5. P53. 6. ESTUDO DE CASO-CONTROLE. I. Silva, Vinícius Duval da. II. Título.

CDD 616.14

CDU 618.14-006.6:616-008.831(043.2)

NLM WP 458

Isabel Merlo Crespo
Bibliotecária CRB 10/1201

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Silvia Helena e Everton, e minha irmã Adriana por me acompanharem em todas as etapas da minha vida com apoio incondicional.

Ao meu marido Carlos, por me encorajar a seguir adiante em todos os aspectos da minha vida, contribuindo efetivamente para esta tese através da análise das imagens e por me mostrar que as coisas sempre podem dar certo.

Ao meu filho Bernardo, que me mostrou que a vida sempre pode me surpreender e ser ainda melhor, és a razão da minha vida.

Ao Dr. Vinicius Duval da Silva, pela paciência e compreensão em todas as etapas deste longo processo, por conciliar competência, serenidade e compaixão nas tarefas difíceis do nosso dia-a-dia.

Ao Dr. Mario Wagner, pela elaboração da análise estatística;

Às acadêmicas de medicina Julia de Gasperi, Luciana Cioffi e Francisca Indrusiak pelo auxílio e apoio na elaboração da parte laboratorial deste trabalho.

Ao técnico em histologia Tiago Giuliani Lopes, pela análise imunohistoquímica das amostras e pela parceria ao longo deste período.

Ao programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, em especial ao Professor Alexandre Padoin e ao secretário Ernesto Amaral por toda a compreensão que tiveram comigo para que eu conseguisse concluir esta tarefa.

Ao serviço de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS, pela amizade e disponibilidade de todos no auxílio ao desenvolvimento da minha tese.

SUMÁRIO

Lista das principais Abreviaturas	iv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 ORIGEM DA ENZIMA SIRTUINA 1 (SIRT 1)	3
2.2 O PAPEL DO SIRT1	5
2.2.1 Gene p53	5
2.2.2 Função hormonal, restrição calórica e longevidade	8
2.2.3 Receptor androgênico e câncer de próstata	9
2.2.4 DBC1 e mama	12
2.2.5 Promotor ou supressor da carcinogênese	15
2.3 TERAPIA EPIGENÉTICA	18
2.4 INIBIDORES DE HISTONAS DESACETILASES	20
2.5 CÂNCER DE ENDOMÉTRIO	23
2.5.1 Epidemiologia , fatores de risco e diagnóstico	23
2.5.2 Histopatologia e alterações moleculares	25
2.5.3 Estadiamento e tratamento cirúrgico	28
2.5.4 Tratamento complementar	31
2.6 IMUNOHISTOQUÍMICA NO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo principal	34
3.2 Objetivo secundário	34
4 ARTIGO EM PORTUGUÊS	35
RESUMO	37
ABSTRACT	38
INTRODUÇÃO	39
PACIENTES e MÉTODOS	41
Imunohistoquímica	42
Método de Contagem	43
Análise Estatística	44
RESULTADOS	44
DISCUSSÃO	52
PERSPECTIVAS FUTURAS	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (DO ARTIGO)	63
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS

aP2	Gene de armazenamento de gordura
AR	Receptor de androgênios
ATP	Adenosina Trifosfato
BAX	Proteína envolvida na apoptose
β -catenina	Subunidade do complexo caderina; envolvida na adesão celular
Ca-125	Marcador tumoral
CBP/p300	Histonas acetiltransferases
CpGs	Citosina nucleotídeo adjacente a Guanina- região DNA
CpGs islands	Seqüências de CpGs encontradas normalmente desmetiladas.
DHT	Dehidrotestosterona
DNA	ADN = ácido dexirribonucléico
E-cadherin	Gene que mantém adesão celular
EX-527	Potente inibidor seletivo da atividade catalítica de SIRT1
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FoxO	<i>Forkhead box transcriptional factor class O</i> : fator de sinalização
HAT	Histonas acetiltransferases
HDAC	Histonas desacetilases
Her2	Oncoproteína
HIC 1	<i>Hypermethylated in Cancer 1</i> : gene supressor tumoral
IGF	<i>Insulin growth fator</i>
IGFBP-1	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 1</i>
IHDAC	Inibidores de histonas desacetilases
ku70	Fator de reparo do DNA
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MHL1	Tipo de gene de reparo de erro de DNA (<i>mismatch repair gene</i>)
MIB1	<i>mindbomb homolog 1</i> : marcador de proliferação celular
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NIA	Nicotinamida: Inibidores gerais de sirtuinas
p16	Componente do ciclo celular, normalmente associado a lesões cervicais

p21	Ciclina: efeito cistostático
p53	Gene supressor tumoral
PAI-1	Inibidor ativação plasminogênio 1: fator encontrado na célula em senescência
PGC1- α	<i>PPARγ - coativator 1α</i> : fator de transcrição na sinalização endócrina
PPAR γ	<i>Peroxime proliferator –activated receptor γ</i> : fator de transcrição na sinalização endócrina
PSA	<i>Psammalin A</i> : inibidor de histonas desacetilases
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> : gene supressor tumoral mutado em diversos tumores
RE/RP	receptor estrogênio / receptor progesterona
RNA _m	ARN = ácido ribonucléico mensageiro
SAHA	Ácido hidroxâmico: inibidor de histonas desacetilases
SA- β -gal	<i>Senescence- associated β galactosidase</i> : fator encontrado na célula em envelhecimento
Sir 2	<i>Silent information regulator 2</i> : histona desacetilase
SIRT1	Sirtuina 1: <i>silent mating type information regulation 2 homolog 1</i> – histona desacetilase
Sirtinol	Inibidor de SIRT1
SPT	Splitomicina: Inibidor específico de Sir 2
TSA	<i>Tricostatin A</i> : inibidor de histonas desacetilases classe I e II
UCP2	<i>Uncoupling protein 2</i> : reduz a capacidade da célula β em converter glicose em ATP

1 INTRODUÇÃO

A cromatina constitui-se de complexos de DNA associados a proteínas estruturais denominadas histonas e não-histonas. Sabe-se que a estrutura da cromatina exerce um papel importante na expressão gênica e que modificações como acetilação, desacetilação e fosforilação de histonas podem levar a mudanças na arquitetura de nucleossomos e remodelamento da cromatina, o que pode resultar em um aumento ou repressão de genes de transcrição.(1) As duas modificações mais estudadas são a acetilação e a desacetilação de lisinas em histonas do núcleo, que são controladas por enzimas denominadas de histonas acetiltransferases (HAT) e histonas desacetilases (HDAC).(2)

Alguns padrões de expressão genética das células resultam do balanço entre a atividade de HAT e HDAC. Um desbalanço na acetilação de histonas está relacionado ao desenvolvimento de diversas doenças, incluindo câncer.(3, 4) Existem atualmente descritas três classes de histonas desacetilases: 1) classes I/II: relacionadas a locais específicos na cromatina e que atuam através de um mecanismo de acetilação Zinco – dependente; 2) classe III ou *sirtuinas*: estruturalmente e mecanicamente distintas das outras classes, atuam através de um mecanismo nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) – dependente.(5) (6)

Dentre as sirtuinas, a enzima Sir 2 (*silent information regulator 2*), localizada no núcleo, foi descrita no fungo *Saccharomyces cerevisiae* e possui importante papel no silenciamento de transcrição genética através de três *loci* específicos: telômeros, DNA ribossomal e locus de silenciamento.(7) Observou-se que na superexpressão de Sir 2 havia uma desacetilação de histonas, o que caracteriza a enzima Sir 2 como uma histona desacetilase (8)

A Sirtuina 1 (SIRT1) pertence à família de enzimas Sir 2 de histonas desacetilases NAD – dependentes encontrada em mamíferos. A desacetilação promovida por SIRT1 parece estar envolvida com a regulação da ativação da transcrição e apoptose relacionada ao gene p53 (gene supressor tumoral). Ainda, em células sob estresse, SIRT1 promove sobrevivência celular por inibir a

apoptose dependente de p53. A SIRT1 parece modificar a cromatina diretamente, silenciar a transcrição gênica, modular o *checkpoint* meiótico e promover um efeito antienvhecimento.(8-10)

O câncer de endométrio é uma das neoplasias mais prevalentes em mulheres na pós-menopausa. O aumento da expectativa de vida observado nas últimas décadas ressaltou a importância da identificação desta enfermidade. A maioria das pacientes no momento do diagnóstico apresenta a doença em estádios precoces, sendo o tratamento cirúrgico eficaz no controle da doença. Pacientes com tumores de alto grau, invasão profunda do miométrio, extensão para cérvix, metástases para linfonodos e doença extra-uterina apresentam maior risco de recidiva sendo indicado tratamento radioterápico adjuvante. A quimioterapia tem sido utilizada na doença avançada ou recorrente, e possui um papel limitado.(11)

Dessa forma, o tratamento desta patologia é basicamente cirúrgico, sendo a radioterapia um tratamento complementar e a quimioterapia um tratamento de resgate com resultados pobres, tornando-se necessária a pesquisa de novas alternativas terapêuticas. Um novo enfoque em oncologia tem sido a busca de moléculas que possam ser alvo de terapia com anticorpos monoclonais. Vários agentes que alteram a metilação do DNA ou modificam as histonas têm sido propostos como novas drogas terapêuticas e seu uso vem sendo testado em vários trabalhos. Inibidores de histonas desacetilases (IHDAC) estão envolvidos em estudos de fase I e II e são capazes de induzir a diferenciação celular, parada no ciclo celular ou apoptose em tumores.(12)

Com o intuito de encontrar um possível alvo terapêutico em câncer de endométrio, buscamos identificar, quantificar e comparar a expressão da enzima SIRT1 (histona desacetilase) em amostras de endométrio tumoral e normal, bem como verificar a expressão de p53 e receptores hormonais de estrogênio (RE) e progesterona (RP).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ORIGEM DA ENZIMA SIRTUINA 1 (SIRT 1)

As moléculas de DNA (ácido desoxirribonucléico) dos cromossomos existem como “complexos” associados a uma família de proteínas cromossômicas básicas denominadas histonas e a um grupo heterogêneo de proteínas ácidas não-histonas. Estes complexos de DNA associados a proteínas denominam-se cromatina. Cerca de 140 pares de bases de DNA estão associados a cada centro de histona.(13)

Assim, a cromatina contém o DNA, histonas e diversas outras proteínas, em um arranjo como um colar de contas. As contas representam os nucleossomos, que consistem em um segmento de DNA firmemente enrolado em um núcleo de 8 moléculas de histonas (2 H2a, 2 H2b, 2 H3 e 2 H4). O segmento entre os nucleossomos é composto primordialmente por DNA, histona de ligação H1 e proteínas não-histonas (Figura 1). As histonas de ligação H1 exercem um papel primordial na regulação de alguns genes de transcrição e parecem estar envolvidas em mecanismos de envelhecimento e apoptose.(14)

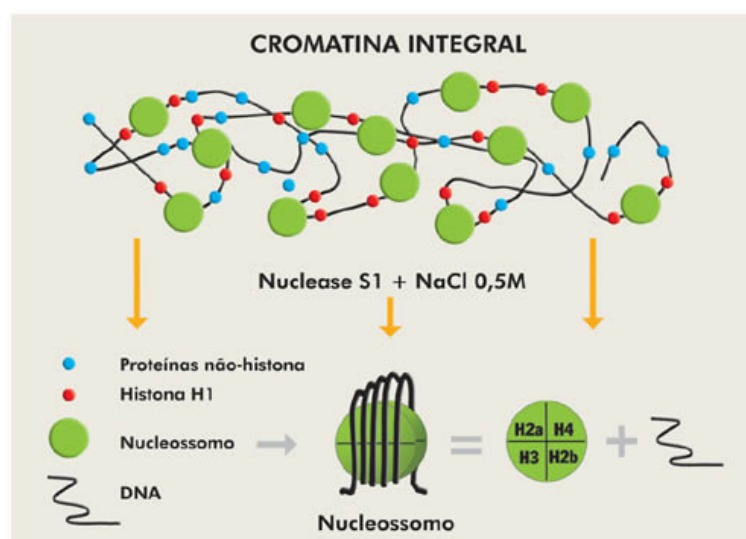


Figura 1: Estrutura da Cromatina (15)

A maioria das histonas é sintetizada na fase S do ciclo celular, chamadas de histonas de replicação dependente. O fato da síntese de DNA ocorrer juntamente à síntese de histonas indica que uma perturbação na coordenação destes dois eventos pode ter conseqüências deletérias para a célula. As células eucarióticas respondem ao dano do DNA ativando várias vias de reparo a fim de manter a integridade do genoma.(16) A radiação ionizante (mecanismo de dano de DNA) em mamíferos induz uma redução nos níveis de RNAm de todos os subtipos de histonas de replicação-dependentes, o que ocorre em paralelo à inibição da síntese de DNA.(17)

Vários estudos recentes têm demonstrado que a estrutura da cromatina exerce um papel importante na expressão gênica. Modificações como acetilação, desacetilação e fosforilação de histonas podem levar a mudanças na arquitetura de nucleossomos e remodelamento da cromatina, o que pode resultar em um aumento ou repressão de genes de transcrição. As duas modificações mais estudadas são a acetilação e a desacetilação de lisinas em histonas do núcleo, que são controladas por enzimas denominadas de histonas acetiltransferases (HAT) e histonas desacetilases (HDAC).(2)

Alguns padrões de expressão genética das células resultam do balanço entre a atividade de histonas acetiltransferases e histonas desacetilases. Um desbalanço na acetilação de histonas está relacionado ao desenvolvimento de diversas doenças, incluindo câncer.(3) (4) Existem atualmente descritas três classes de desacetilases:1) classes I/II: relacionadas a locais específicos na cromatina e que atuam através de um mecanismo de acetilação Zinco – dependente; 2) classe III ou sirtuinas: estruturalmente e mecanicamente distintas das outras classes, atuam através de um mecanismo nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) – dependente.(5, 6)

Dentre as sirtuinas, a enzima Sir 2 (*silent information regulator 2*), localizada no núcleo, foi descrita no fungo *Saccharomyces cerevisiae* e possui importante papel no silenciamento de transcrição genética através de três *loci* específicos: telômeros, DNA ribossomal e locus de silenciamento.(7) Observou-se que na superexpressão de Sir 2 havia uma desacetilação de histonas, o que caracteriza a enzima Sir 2 como uma histona desacetilase. (8)

O processo de silenciamento genético requer resíduos de lisina na porção amino-terminal de proteínas histonas H3 e H4. Estes e outros resíduos de histonas estão acetilados quando a cromatina está ativa e estão desacetilados na cromatina silenciada.(8) A Sir 2 possui um mecanismo NAD dependente: para cada lisina desacetilada, uma molécula de NAD é clivada e produz nicotinamida e O-acetyl-ADP-ribose. Este último composto tem sido proposto como um importante sinalizador, cofator, para a atividade catalítica do efeito silenciador do gene Sir 2.(18)

A Sirtuina 1 (SIRT1) pertence à família de enzimas Sir 2 de histonas desacetilases NAD – dependentes encontrada em mamíferos. Desacetila as lisinas 9 e 14 da histona H3 e especificamente a lisina 16 da histona H4; possuindo um domínio catalítico comum que se conserva desde os fungos até humanos. A desacetilação promovida por SIRT1 parece estar envolvida com a regulação da ativação da transcrição e apoptose relacionada ao gene p53 (gene supressor tumoral). Ainda, em células sob estresse, SIRT1 promove sobrevivência celular por inibir a apoptose dependente de p53. A SIRT1 parece modificar a cromatina diretamente, silenciar a transcrição gênica, modular o *checkpoint* meiótico e promover um efeito antienvelhecimento. O gene SIRT1 localiza-se no cromossomo humano 10q21.3.(8-10)

2.2 O PAPEL DO SIRT1

2.2.1 Gene p53

O gene supressor tumoral p53 exerce um efeito antiproliferativo que inclui parada no ciclo celular, apoptose e envelhecimento celular em resposta a vários tipos de estresse.(19) Mutações no gene p53 têm sido documentadas em vários tumores e terapias com drogas antitumorais têm sido baseadas na reativação deste gene e na inativação de genes antagonistas. A ativação do gene p53 parece ser mediada através de mecanismos de fosforilação e acetilação, envolvendo histonas acetiltransferases, como a CBP/p300. (20) Uma vez que a sirtuina 2 (Sir 2) em fungos apresenta uma atividade de silenciamento genético e expansão do ciclo celular, foi desenvolvido um estudo

em células de camundongo e humanas, com o intuito de demonstrar a interação entre Sir 2 / SIRT1 e p53. (9) Este estudo evidenciou que : 1) o gene p53 se liga fortemente ao Sir 2 (camundongos) e SIRT1 *in vitro* e *in vivo*, sendo um substrato para Sir 2; 2) a desacetilação promovida pela Sir 2 antagoniza a ativação e apoptose via p53; 3) a desacetilação de p53 mediada por Sir 2 é inibida pela NICOTINAMIDA (inibidor SIRT1); 4) a Sir 2 inibe a apoptose dependente de p53 em resposta ao dano DNA e ao estresse oxidativo, mas não de uma forma p53 independente; 5) a expressão da mutação de Sir 2 aumenta a sensibilidade das células em resposta ao estresse. Assim, os autores concluem que Sir 2 promove a sobrevivência celular sob estresse por inibir a apoptose dependente de p53.(9)

Para testar a interação entre o gene p53 e Sir 2 foi realizado um experimento utilizando linhagens celulares de câncer de pulmão.(21) Observou-se que SIRT1 se liga diretamente com a proteína p53 *in vivo* e especificamente desacetila o resíduo K382 na porção C- terminal de p53. A consequência funcional desta ação é a atenuação da atividade de p53 como um fator de transcrição sobre p21 (a acetilação de p53 promove *upregulation* da ciclina p21 – produzindo o efeito citostático). Deste modo, a partir destas observações, pode-se inferir que, em células de mamíferos, a sinalização do sucesso do reparo completo do dano celular pode ser mediada via SIRT1 para proteínas acetiladas como o p53 que estavam incumbidas de realizar parada no ciclo celular a partir do dano do DNA. Através da desacetilação de p53 há reversão da apoptose e entrada da célula em seu processo fisiológico. A partir dos conceitos prévios de que a maioria dos tumores humanos apresenta alteração na sinalização genética via p53, pode-se inferir que a superexpressão de SIRT1 em células cancerígenas incipientes poderia contribuir para a inativação de p53. Ainda, inibidores de desacetilases, como SIRT1, poderiam potencializar a apoptose de células cancerígenas, constituindo potenciais drogas antitumorais.(21)

O HIC1 (*Hypermethylated in Cancer 1*) é um gene supressor tumoral sinérgico ao p53 e inativado em alguns tumores. Tem como função regular a apoptose dependente de p53 em resposta ao dano de DNA. Através do domínio POZ, o HIC1 é complexado com a SIRT1 e promove a expressão da

mesma. Esta interação e regulação da transcrição da SIRT1 parecem ser essenciais para o controle da resposta do p53 ao dano de DNA. A inativação do HIC1 leva a uma superexpressão da SIRT1 em células normais ou cancerosas e isto desacetila e inativa o gene p53, permitindo às células não entrarem em apoptose e sobreviverem ao dano no DNA. Assim, um aumento na expressão de SIRT1 pode prolongar a sobrevivência celular ou envelhecimento e deste modo, aumentar o risco de câncer. Concluindo, a perda de HIC1 leva a um aumento de SIRT1 que desacetila p53, impedindo o controle sobre a apoptose celular.(22)

Com o intuito de examinar o papel de SIRT1 na função de p53 foi realizado um estudo utilizando um potente inibidor seletivo da atividade catalítica de SIRT1 denominado EX-527. (23) Em células submetidas ao dano de DNA (através do uso de Etoposide), a inibição de SIRT1 pelo EX-527 resultou em um aumento da acetilação de p53, porém não houve um aumento na expressão de genes controlados pelo p53 (p21 e BAX), sobrevivência ou proliferação celular em linhagens de células epiteliais mamárias. Em contraste, o uso de inibidor de histonas desacetilases de classes I e II – TRICOSTATIN A (TSA) – provocou um aumento na acetilação de p53 com redução da sobrevivência e crescimento. O uso concomitante de EX-527 e TSA provocou um aumento na acetilação de p53 sem alterar a sobrevivência e o crescimento celular. Assim, SIRT1 desacetila p53, mas não altera a viabilidade e proliferação celular após o dano DNA; além disso, o uso de TSA combinado com EX-527 é sinérgico para o aumento da acetilação, mas não para sobrevivência celular (em contraste com o uso isolado de TSA). Desta forma, apesar de SIRT1 desacetilar p53, parece não existir um papel na sobrevivência celular em algumas linhagens epiteliais, o que sugere que a interação de SIRT1 com outras proteínas pode ser mais importante do que sua ação catalítica.(23)

Outro estudo envolvendo o uso de substância antitumoral *Evodiamina* em linhagens de células de melanoma demonstrou uma diminuição na expressão de SIRT1 e um aumento na atividade de p53 e da proteína Bax, sugerindo que a inativação de SIRT1 pode estar envolvida na morte celular através de p53 e Bax induzida por esta substância.(24)

A partir destes trabalhos pode-se afirmar que existe interação entre SIRT1 e p53 e que a desacetilação de p53 induzida por SIRT1 é capaz de inibir a apoptose em alguns tecidos, mas o potencial efeito desta ação ainda esta para ser bem estabelecido.

2.2.2 Função hormonal, restrição calórica e longevidade

O fator IGFBP-1 (*Insulin-like growth factor-binding protein 1*) exerce múltiplas funções fisiológicas através de mecanismos dependentes e independentes do fator IGF (*Insulin growth factor*), como metabolismo da glicose, crescimento pós-natal, regeneração celular e sobrevivência. A expressão de IGFBP-1 é rapidamente regulada através da transcrição genética promovida por hormônios e citocinas. Fatores de transcrição como FoxO (*forkhead box transcriptional factor class O*) interagem com respostas seqüenciais de insulina e mediam o efeito inibitório da insulina na expressão de IGFBP-1. O fator FoxO parece ser acetilado por p300/CBP e desacetilado por SIRT1, assim, SIRT1 parece desacetilar e aumentar a função destes fatores. A fim de verificar o papel de SIRT1 nesta via, foi realizado um estudo para testar a interação de SIRT1 com FoxO e concluiu-se que a expressão de SIRT1 estimula IGFBP-1 de modo dependente e independente de FoxO. A via independente de FoxO parece utilizar outros fatores como MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Deste modo, existe um papel de SIRT1 na regulação IGFBP-1 e nas rotas metabólicas associadas a este fator.(25)

As vias de sinalização endócrina coordenam o desenvolvimento fisiológico normal e participam de patologias como o Câncer e Diabetes. Estas vias respondem a inúmeros sinais externos, incluindo estresse ambiental e aporte de nutrientes; a compreensão destas vias pode ser um passo fundamental para o desenvolvimento de novas terapêuticas. Em uma revisão sobre o papel de SIRT1 e a sinalização endócrina, foi realizado um estudo descrevendo uma série de eventos sinalizadores que ocorrem a partir da restrição calórica ou jejum:

- durante período de restrição calórica ou jejum há ativação da transcrição de SIRT1;

- SIRT1 ativa a gliconeogênese e reprime a glicólise no fígado via desacetilação de PGC1- α , aumentando a liberação de glicose na corrente sanguínea;

- no pâncreas, SIRT1 reprime a transcrição de UCP2 (*uncoupling protein 2*: reduz a capacidade da célula β em converter glicose em ATP), aumentando, assim, a síntese de ATP a partir da glicose e, conseqüentemente, aumentando a secreção de insulina;

- no tecido adiposo, SIRT1 inibe depósito e aumenta a liberação de gordura através da repressão de PPAR γ . (26)

Em um estudo envolvendo restrição calórica em ratos houve um aumento da expressão de SIRT1 associada à proteína ku70, modulando a suscetibilidade das células à apoptose induzida pelo estresse. No mecanismo de apoptose induzida pelo estresse, existe uma recolocação da proteína citoplasmática Bax para a membrana externa da mitocôndria e liberação de citocromo C. Na célula normal, a proteína Bax é inativada através da associação com o fator de reparo do DNA denominado ku70. Durante o estresse, acetiltransferases acetilam lisinas K539 e K542 em ku70 e rompem a ligação ku70 - Bax, permitindo que a proteína Bax se una à mitocôndria e inicie apoptose. A ação do SIRT1 consiste em manter os resíduos de lisinas K539 e K542 de KU70 em um estágio desacetilado para deixar a proteína Bax longe da mitocôndria, impedindo o início da apoptose e aumentando a sobrevivência celular. (27) Em outro estudo sobre restrição calórica em ratos, verificou-se que durante o período de fome a enzima SIRT1 se liga ao gene de armazenamento de gordura *aP2*, reprimindo sua transcrição gênica e promovendo a liberação de gorduras para a corrente sanguínea (*downregulation* da adipogênese).(28)

2.2.3 Receptor androgênico e câncer de próstata

Anormalidades no receptor de androgênios (AR) têm sido relacionadas à patogênese e progressão do Câncer de Próstata. O receptor de androgênios é

um fator de transcrição DNA-ligante que determina a diferenciação e o desenvolvimento sexual masculino, sendo sua atividade regulada por hormônios, como a dehidrotestosterona (DHT), que aumenta co-fatores como p300 e inibe histonas desacetilases, sugerindo que a acetilação de AR é uma consequência fisiológica da ativação hormonal.(29) Os níveis de acetilação são controlados por histonas acetilases e histonas desacetilases. A partir dos estudos envolvendo SIRT1 com p53 e sobrevivência celular ao estresse, desenvolveu-se um trabalho com o intuito de verificar o papel de SIRT1 na função do receptor androgênico *in vitro* e *in vivo* e identificou-se que:

- células tumorais de próstata que expressam AR (linhagem LNCap) tratadas com SIRTINOL (inibidor de SIRT1) tiveram um aumento na acetilação de receptores de androgênios, sugerindo um papel de SIRT1 na regulação da acetilação de AR;

- SIRT1 reduz os níveis basais de receptores de androgênios em 10% e praticamente anula os níveis de DHT induzidos pelo excesso de AR, assim, a atividade transcricional de AR é reprimida por SIRT1;

- SIRT1 reprime p300 (acetilase – promove a ativação de AR);

- o crescimento celular das células tumorais de próstata foi inibido pela expressão de SIRT1, o que sugere que SIRT1 inibe carcinogênese, bloqueando proliferação celular;

- a fim de verificar o papel de SIRT1 em células tumorais que expressam ou não AR, foi comparado o crescimento de duas linhagens tumorais, uma que expressa AR e outra deficiente em AR; nas linhagens tumorais de próstata que não expressam AR (PC3 e DU 145), a expressão de SIRT1 não afetou o crescimento celular.

- mutações pontuais no AR resultam em resistência à repressão de SIRT1.

Assim, SIRT1 possui um papel na redução da sinalização e da função dos receptores de androgênios. O aumento da atividade destes receptores, a partir da perda de fatores repressores, têm sido relacionado ao crescimento células tumorais de próstata. SIRT1 parece exercer um papel inibitório nestes

receptores e promover a regulação da proliferação das células tumorais (fator protetor de sirt1). (30)

Outro estudo envolvendo três linhagens celulares tumorais de próstata (LNCap PC3 e DU 145), verificou um aumento na expressão de SIRT1 em todas as linhagens em comparação com as células normais de próstata. Este aumento foi de 2,2 e 2,5 vezes maior na linhagem PC3 e DU145 (não expressam AR) em comparação à linhagem LNCap (expressa AR), identificado através de *real-time PCR*. O uso de SIRTINOL (inibidor de SIRT1) promoveu quimiossensibilização de cisplatina e campotecina, resultando em inibição do crescimento celular nas linhagens PC3 e DU145 (linhagens com maior expressão de SIRT1). A diferença de expressão de SIRT1 nas linhagens também pode ser devida à falta de expressão de p53 na linhagem PC3, causando um aumento na expressão de SIRT1. O papel de SIRT1 no crescimento celular parece ser diferente nas linhagens celulares de tumores de próstata dependendo dos receptores de androgênio. Nas linhagens sensíveis aos androgênios (LNCap), há inibição do crescimento celular na presença de deidrotestosterona e superexpressão de SIRT1, ao passo que nas linhagens que não expressam androgênios (PC3 e DU145), SIRT1 está associada a maior resistência aos quimioterápicos e à proliferação celular. (31)

Com o objetivo de determinar a expressão de SIRT1 em tumores de próstata, foi realizado um estudo utilizando 30 biópsias de tumores malignos de próstata submetidos à análise imunohistoquímica de SIRT1, Bax e bcl-2. O percentual de células positivas para SIRT1 foi maior nos tumores em comparação com células normais luminais, bem como a intensidade da coloração de SIRT1 também foi 2x maior nas células tumorais (fator promotor da carcinogênese). Houve expressão de Bax nas células tumorais (98%) e não nas células normais; porém não houve relação entre a intensidade da expressão de Bax e SIRT1. Houve mínima expressão de bcl-2 nas células tumorais. Estes achados sugerem que em tumores de próstata, há superexpressão de SIRT1 podendo este marcador ter função promotora da carcinogênese. Contudo, outros estudos também em tumores de próstata verificaram que SIRT1 poderia ter um papel protetor nas linhagens que expressam receptores androgênicos. As controvérsias a respeito de SIRT1

demonstra a complexidade desta enzima e seu papel em diferentes mecanismos celulares. Mais estudos envolvendo SIRT1 e esclarecendo sua função nos diferentes tecidos devem auxiliar a esclarecer este potencial alvo terapêutico.(32)

Recentemente outro estudo envolvendo SIRT1 e próstata foi desenvolvido para verificar a interação com *coactactin*. A proteína *coactactin* está aumentada em tumores de cabeça e pescoço, esôfago, estômago, cólon, mama e ovário e está associada a migração e invasão das células tumorais. SIRT1 interage diretamente e desacetila *coactactin*, promovendo a migração celular. A fim de verificar a expressão de *coactactin* nos tumores de próstata, foi feito um estudo utilizando as linhagens celulares DU145, LNCap e PC3. *Coactactin* está superexpressa na linhagem DU145 em comparação com as demais. A perda da expressão de *coactactin* e de SIRT1 nas linhagens DU 145 evidenciaram diminuição na invasão mais do que na migração das células. Deste modo, SIRT1 e *Coactactin* teriam um efeito promotor nas linhagens DU145. (33)

2.2.4 DBC1 e mama

Sirt1 está envolvido em diversas rotas celulares regulatórias que envolvem alguns substratos como p53, FOXO e ku 70- fatores envolvidos na apoptose celular, silenciamento genético, metabolismo da glicose e gorduras e envelhecimento. Vários estudos colocam SIRT1 entre um papel promotor ou supressor da carcinogênese. Recentemente, DBC1 (*Deleted in Breast Cancer 1*), uma proteína nuclear com gene localizado no cromossomo 8p21 deletado homocigoticamente em células com câncer mama, têm sido alvo de estudos envolvendo sua relação com SIRT1. Observou-se que DBC1 interage diretamente com SIRT1 *in vitro* e *in vivo*, inibindo sua atividade, ou seja, DBC1 seria um inibidor natural de SIRT1. Assim, a superexpressão de DBC1 resulta em hiperacetilação de p53 – DBC1 atua bloqueando a habilidade de SIRT1 em desacetilar p53 (SIRT1 promove inibição de p53), levando a apoptose. Uma depleção da expressão de DBC1 aumentaria o poder inibitório de SIRT1 sobre a apoptose (desacetila p53), ou seja, teria um efeito anti-

apoptótico. (34) Um estudo envolvendo linhagens celulares de osteosarcoma, foi realizado para verificar a interação entre DBC1 e SIRT1. As linhagens com depleção de DBC1 foram resistentes à apoptose, observando-se uma inativação da resposta de p53 ao dano celular. (35) Assim, DBC1 inibe SIRT1 e promove a apoptose via p53.

A interação entre SIRT1 e receptores hormonais também vem sendo estudada. Sabe-se que o estrogênio é um componente importante no desenvolvimento da glândula mamária e da carcinogênese dos tumores de mama. A relação entre SIRT1 e receptores de estrogênios alfa ($ER\alpha$) foi estudada em linhagens de células de tumores de mama. Verificou-se que nas linhagens tumorais com receptores hormonais positivos para $ER\alpha$ (linhagem MCF-7) tratadas com Nicotinamida (inibidor de histonas desacetilases classe III –IHDAC III) ou Sirtinol (inibidor específico de SIRT1) houve diminuição dos níveis de RNAm de $ER\alpha$ confirmado por real time PCR, demonstrando um efeito positivo de SIRT1 na expressão dos receptores de estrogênio $ER\alpha$. (36)

Outro estudo utilizando linhagens celulares de tumores de mama MCF-7, verificou a associação entre CCAR1 (*Cell Cycle and Apoptosis Regulator 1*), DBC1 e SIRT1 na expressão de receptores hormonais. CCAR1 se liga ao receptor de estrogênio $RE\alpha$ e induz a proliferação das células tumorais de câncer de mama estrogênio-dependentes. Apesar de DBC1 ter sido levantado como gene supressor tumoral ao inibir SIRT1 e assim promover a apoptose via p53, alguns estudos tem demonstrado um aumento na expressão de DBC1 em tumores de mama. DBC1 possui um efeito sinérgico ao CCAR1, promovendo um aumento da função do $RE\alpha$ (DBC1 com efeito promotor sobre $RE\alpha$). SIRT1 atua nesta rota inibindo a ligação entre CCAR1 e DBC1 – compete com CCAR1, promovendo redução de $RE\alpha$ (SIRT 1 com efeito inibitório sobre $RE\alpha$). Ainda, DBC1 inibe a interação entre SIRT1 e receptor $RE\alpha$. Concluindo, DBC1 ativa CCAR1 (que ativa $RE\alpha$) e inibe SIRT1 (que inativa $RE\alpha$). Neste estudo, SIRT1 teria um papel inibitório na expressão dos receptores estrogênio. (37)

A interação entre receptores hormonais e SIRT1 também foi verificada em outro estudo com linhagens MCF-7. Sabe-se que o estrogênio é um importante fator carcinogênico nas neoplasias de mama e que seu metabólitos oxidativos são responsáveis pelo dano ao DNA e mutações. Receptor de

estrogênio alfa (RE α) promove o transporte de metabólitos tóxicos do estrogênio para o núcleo da célula aumentando o dano oxidativo ao DNA. Algumas enzimas removem esses metabólitos genotóxicos, como NQO1 e GSTs (glutathione S transferases). O fator de transcrição NFR2 se liga a fatores de resposta a elementos antioxidantes (ARE) e promove a transcrição NQO1 e GSTs. Moduladores dos receptores de estrogênios (SERMs), como tamoxifeno, atuam preferencialmente em receptores de estrogênio beta (RE β), ativando a transcrição de NQO1. Uso de estrogênio nas células tumorais de mama linhagem MCF-7 inibiu a atividade de NQO1. RE α e SIRT1 atuam promovendo a inativação da transcrição de NQO1 (efeito repressor). O uso de Shikonina (antiestrogênio) inibiu a expressão de RE α , revertendo o efeito inibitório sobre NQO1. (38)

A expressão imunohistoquímica de DBC1, SIRT1 e p53 foi testada em um estudo com 122 casos de tumores de mama, sendo considerada análise positiva se escore de 30% ou mais das células tumorais coradas. A expressão positiva de DBC1 ocorreu em 71% das pacientes e de SIRT1 em 67%. A expressão de SIRT1 mostrou correlação com metástases à distância e expressão de p53. Nos tumores com receptor de estrogênio positivo, a expressão de DBC1, SIRT1, HER2 e p53 foi significativamente associada a metástases. Nos tumores RE negativos, apenas o estágio teve correlação com metástases. Nas pacientes submetidas a tratamento hormonal, a expressão de DBC1 foi associada a piora na sobrevida.(39)

Outro estudo utilizando 48 espécimes de biópsias de tumores de mama em pacientes pré-quimioterapia, foi realizado como intuito de verificar a expressão imunohistoquímica de SIRT1 e DBC1, demonstrando positividade em 98% e 85 % das pacientes respectivamente. A expressão de DBC1 foi associada ao grau nuclear do tumor; DBC1 E SIRT1 se correlacionou inversamente com her2, sendo a baixa expressão de ambos associada a melhor resposta à quimioterapia (SIRT 1 E DBC1 marcadores de resposta). (40)

Assim, podemos verificar que o papel de SIRT1 na carcinogênese ainda está indefinido, sendo eventualmente o de promotor e eventualmente o de

supressor tumoral, dependendo das rotas celulares e dos diferentes tecidos envolvidos. (41)

2.2.5 Promotor ou supressor da carcinogênese

Os eventos regulatórios que afetam a quantidade, a estabilidade e a atividade de p53 em parte são devidos a uma variedade de modificações pós-translacionais, que incluem fosforilação, ubiquitinação e acetilação. P53 é acetilado pela histona acetiltransferase CBP/p300 e este evento é essencial para sua ativação. Alguns estudos demonstraram que a superexpressão de SIRT1 atenua a transcrição de p53, tanto via apoptose (através de genes alvos como Bax, PUMA e NOXA), quanto na via apoptose-independente (através da liberação de Citocromo C da membrana intramitocondrial). Assim, SIRT1 parece bloquear a translocação nuclear de p53 através de sua desacetilação. (42)

No mecanismo de carcinogênese, p53 exerce papel fundamental como agente supressor tumoral, produzindo parada no crescimento celular, apoptose e envelhecimento celular. Mutações no gene P53 são documentadas em vários tipos de tumores. A partir do conhecimento que SIRT 1 regula negativamente p53, é possível considerar um papel de SIRT 1 na promoção de tumores. Vários estudos demonstraram este papel, em tumores de próstata, pele, colón e leucemia. Ao mesmo tempo, alguns estudos demonstram um papel de supressor tumoral. SIRT1 suprime *survivin* em pacientes com câncer de mama associados ao BRCA1. *Survivin* é uma proteína que inibe a apoptose e está aumentada em vários tumores. Tumores de mama associados a BRCA1 possuem baixos níveis de SIRT1 e altos níveis de *survivin*. Deste modo, substâncias que ativam SIRT1 podem ser alvo terapêutico nos tumores que expressam *survivin*. O papel multifuncional de SIRT1, atuando como promotor e supressor da carcinogênese, é alvo de drogas tanto inibidoras como ativadoras. Resveratrol é um composto natural ativador de SIRT1, mas seus efeitos são controversos. Tenovin 1 e tenovin 6 são moléculas em estudo com efeito inibitório em SIRT1 e SIRT2. Tenovin 6 promove a ativação de p53.(43)

A acetilação de p53 e seu papel como supressor tumoral tem sido exaustivamente estudado nos últimos 15 anos. O fato de SIRT 1 desacetilar p53 sugere que o eixo SIRT1 –p53 possa ser uma alvo terapêutico. Vários inibidores de SIRT1 tem sido estudados (AROS, Nicotinamida, Sirtinol, Salermide, Inauhzin, Tenovin), todos com o objetivo de ativar p53. Contudo, alguns estudos colocam SIRT 1 como supressor tumoral por desacetilar oncogenes como β catenina e c-Myc. Assim, a ação de SIRT1 depende do perfil genético de cada tumor. (44)

TIREÓIDE

Os receptores de tireóide (TR) pertencem a família de receptores hormonais nucleares e regulam a transcrição gênica através da ligação com sequências específicas de DNA (fatores de resposta aos hormônios tireoidianos). Com o intuito de verificar a existência de uma relação entre SIRT1 e TR, foi desenvolvido um estudo utilizando linhagens celulares hepáticas e mecanismo de gliconeogênese. Verificou-se que SIRT1 interage com PGC1 α (fator induzido em diferentes tecidos e que potencializa a ação dos receptores de tireóide) aumentando a resposta ao hormônio tireoidiano (T3). Há também interação direta com TR β 1, promovendo desacetilação de TRB1 na presença de T3. Assim, drogas que interagem com SIRT1 (ex: Resveratrol) também podem modular a resposta dos hormônios tireoidianos. (45)

OVÁRIO

Prostaglandina 15d-PGJ2 é um agonista natural do receptor PPAR γ com propriedades antitumorais (inibe a progressão das células tumorais). Induz a apoptose através de várias rotas, atuando em PPAR γ , NF- κ B e caspases. NF κ B tem sido associado à resistência ao tratamento com drogas e a genes antiapoptóticos (bcl-2 e bcl-xl). A superexpressão de SIRT1 também tem sido observada em alguns tumores quimiorresistentes, sendo que a inibição de SIRT1 aumenta a sensibilidade às drogas. Utilizando linhagens celulares de carcinoma de ovário selvagens (A2780) e resistentes a doxorubicina (A2780/AD), o uso de 15d-PGJ2 induziu a apoptose nas duas linhagens independente de PPAR γ ; nas linhagens doxo-resistentes houve diminuição significativa na expressão de bcl-2 e bcl-lx. Ainda, 15d-PGJ2 reduziu a

expressão de SIRT1. Estes dados fornecem substrato para 15d-PGJ2 ser utilizado como droga no auxílio às pacientes resistentes ao tratamento convencional.(46)

Comparando células cancerígenas de tumores de ovário sem mutação identificada, com mutação BRCA1 e com mutação BRCA2 e nos tecidos normais adjacentes, houve redução importante na expressão de SIRT1, aumento dos níveis NAD e subsequente aumento da atividade de SIRT1 nos tumores com inativação de BRCA1 . Assim, a inativação de BRCA1 é um fator de regulação positiva na expressão de SIRT1 e fator de regulação negativa da atividade de SIRT1 relacionada a NAD, possibilitando um mecanismo compensatório da perda da expressão de SIRT1 para manter a função de SIRT1. (47)

DIVERSOS TUMORES

Vários artigos seguem investigando o papel de SIRT1 na carcinogênese:

- Leucemia: BCR-ABL (ativa proliferação celular nas células hematopoiéticas) ativa a expressão de SIRT1 promovendo a sobrevivência e proliferação celular associada a desacetilação de múltiplos substratos como FOXO, p53 e Ku70.(48)
- Carcinoma de pulmão: células de tumores de pulmão tratadas com ASODN (*antisense* oligonucleotídeos) reduziu a expressão de SIRT1, induzindo parada do ciclo celular em G1 e apoptose através do aumento da acetilação de p53 e da expressão de Bax, aumentando os efeitos antiproliferativos induzidos pela radiação.(49) Além disso, em um estudo utilizando imunohistoquímica em 125 casos de tumores primários de pulmão tratados com cirurgia, a expressão de SIRT1 foi aumentada em 26 casos (20,8%) e teve correlação com alto índice de ki67 e alto estadiamento TNM, principalmente associado a invasão linfática e metástases (efeito promotor).(50)
- Carcinoma escamoso da cavidade oral: a superexpressão de SIRT1 nos tumores resistentes à cisplatina está associada a sobrevivência celular. O uso de inibidores SIRT1 (BLM-210, nicotinamida) diminuíram a resistência à cisplatina. (51)

- Mieloma múltiplo (MM): novo agente SRT1720 cujo alvo é SIRT1, foi capaz de induzir a apoptose em células tumorais MM (inibindo SIRT1).(52)
- Câncer de Cólon: análise imunohistoquímica da expressão de SIRT1, DBC1, survivin, β catenina e p53 foi analisada em 349 pacientes. A superexpressão de SIRT1 e β catenina foram associadas à melhora na sobrevida (fator protetor). A expressão de SIRT1 não esteve associada a expressão de p53.(53)
- Sarcoma de partes moles: expressão de SIRT1, DBC1, p53, β catenina e ciclina D1 foram associadas a alto grau, estágio clínico avançado, numero de mitoses e metástases à distância.(54)
- Carcinoma gástrico: expressão de SIRT1 e DBC1 foram associadas a baixo grau histológico, estadiamento inicial e ausência de invasão linfática (fator de bom prognóstico).(55)
- Carcinoma hepatocelular: SIRT1 possui alta expressão nestes tumores, sendo que a inibição de SIRT1 leva a inibição da proliferação celular via indução do envelhecimento e apoptose.(56)
- Melanoma: a expressão de SIRT1 está aumentada em tecidos e linhagens celulares de melanoma. Tratamento de linhagens celulares com tenovin 1 (inibidor de SIRT1) resulta em declínio do crescimento celular e aumento da expressão e atividade de p53.(57)

O papel de SIRT1 e sua interação com p53 e outras rotas metabólicas parece depender dos diferentes tipos de tecidos e mais estudos buscando identificar o papel na carcinogênese e o uso de drogas (inibidoras x ativadoras) devem surgir.

2.3 TERAPIA EPIGENÉTICA

O termo epigenética define todas as mudanças meióticas e mitóticas na expressão genética que não estão codificadas na própria seqüência de DNA. Há 3 sistemas utilizados na iniciação e no silenciamento epigenético que são:

metilação de DNA, silenciamento associado ao RNA e modificações nas histonas. Qualquer desbalanço na interação entre estes sistemas pode levar à expressão inapropriada ou ao silenciamento de genes, resultando nas doenças epigenéticas, que podem ser herdadas ou adquiridas.(12)

A principal modificação epigenética em mamíferos, particularmente em humanos, é a metilação de resíduos de citosinas nucleotídeos. Na célula normal, os padrões de metilação de DNA são conservados através das divisões celulares permitindo a expressão de um grupo particular de genes necessários para aquele tipo celular e bloqueando a expressão de seqüências exógenas. Na célula tumoral existe uma clara distorção no perfil de expressão e a presença de uma dramática mudança nos padrões de metilação. Inicialmente há uma desregulação das enzimas metiladoras, principalmente das DNA-metiltransferases 1, 3a e 3b. Secundariamente há uma hipometilação global, quando comparada com a célula normal, devido a uma desmetilação generalizada nas CpGs espalhadas através dos genes o que pode estar relacionado à fragilidade genômica global. Finalmente, há regiões localizadas, normalmente isentas de metilação, que se tornam hipermetiladas. Estas regiões denominadas de *CpGs islands* tornam-se hipermetiladas interrompendo a expressão do gene adjacente, como um gene supressor tumoral e, então, permitindo o crescimento dos tumores.(58)

As mudanças epigenéticas possuem um papel fundamental no desenvolvimento do câncer, como no caso dos tumores colorretais, onde um grande percentual de pacientes com instabilidade de microsatélites apresentam metilação e silenciamento do gene MHL1 (gene de reparo de erro).(12) A instabilidade de microsatélites é definida pelas inserções ou deleções aberrantes de mono ou dinucleotídeos. Aproximadamente 90% dos tumores de cólon, endométrio e estômago que apresentam instabilidade de microsatélites apresentam MHL1 hipermetilado e esta alteração parece ser um evento inicial e presente em alterações pré-malignas como a hiperplasia de endométrio e lesões de colite ulcerativa.(58)

O cenário atual permite afirmar que o câncer é uma doença poliepigenética, onde genes envolvidos em vários processos celulares, como

ciclo celular, apoptose, mecanismos de adesão celular e transmissão hormonal estão inativados pela hipermetilação.(58)

Vários agentes que alteram a metilação do DNA ou modificam as histonas têm sido propostos como novas drogas terapêuticas e seu uso vem sendo testado em vários trabalhos. Inibidores da metilação de DNA e inibidores de histonas desacetilases (IHDAC) são as duas classes envolvidas em estudos de fase I e II. Os inibidores de histonas desacetilases podem induzir a diferenciação, parada no ciclo celular ou apoptose em tumores. A hipótese é que o acúmulo de proteínas acetiladas, principalmente de histonas, resulta na indução de genes que estavam epigeneticamente silenciados, como a p21, que se encontra aumentada após tratamento com estas drogas, mesmo na ausência de p53 (a p21 é uma citocina inibidora do ciclo celular). Uma vez que existem vários tipos de inibidores de HDACs, torna-se importante desenvolver terapias específicas para uma determinada enzima e assim melhorar a precisão deste tratamento.(12)

A consequência da inibição de HDAC e de DNA - metiltransferases é a reativação de genes anormalmente silenciados nas células tumorais, incluindo genes supressores tumorais, reguladores do ciclo celular e receptores hormonais; todos com potenciais ações antitumorais. Estudos com drogas inibidoras de histonas desacetilases em tumores de endométrio estão em uma fase pré-clínica (linhagens celulares) e já demonstram indução da apoptose e parada no ciclo celular. A combinação de tratamento com moduladores epigenéticos pode facilitar a ação de agentes convencionais (quimioterápicos) e melhorar a estratégia de tratamento.(59)

2.4 INIBIDORES DE HISTONAS DESACETILASES

Alterar a expressão gênica através da modificação da cromatina parece ser um alvo clínico viável. Estudos da década de 70 indicavam que a cromatina ativa se encontrava acetilada, enquanto que cromatina silenciada estava desacetilada. Histonas acetiltransferases e desacetilases podem modificar outras proteínas incluindo fatores de transcrição, resultando na alteração do DNA e de sua atividade. Específicas regiões do genoma nas células

cancerígenas são anormalmente hipermetiladas levando ao silenciamento de genes supressores tumorais. Inibidores de histonas desacetilases (HDACI) estão sendo testados em leucemia e tumores sólidos, porém, seu mecanismo de ação e toxicidade ainda não estão bem definidos. Compostos naturais e sintéticos foram caracterizados, desde componentes simples como o butirato até agentes mais complexos como ácidos hidroxâmicos (SAHA), tetrapeptídeos cíclicos e benzamidas. O tratamento com linhagens tumorais com HDACIs induz a parada do ciclo celular em G1.(60)

Moléculas que inibem as classes I/II de inibidores de HDACs são ineficazes em inibir sirtuínas e vice-versa. Os inibidores de classes I/II induzem mudanças diferenciais na expressão genética do RNA mensageiro de sirtuínas em cultura celular, especificamente aumentando a expressão de SIRT 2, 4 e 7 e diminuindo a expressão de SIRT1, 5 e 6. Poucos inibidores específicos de sirtuínas tem sido relatados, incluindo SIRTINOL 1, SPLITOMICINA e NICOTINAMIDA. Análogos de SIRTINOL foram testados em cultura de células com expressão de Sir 2, SIRT1 e SIRT2. Dois deles demonstraram um potencial 2 a 10x maior de inibição de SIRT1 e SIRT2 quando comparados com SIRTINOL, sugerindo uma nova possibilidade de inibidores.(5)

Utilizando linhagens de células tumorais humanas de câncer de mama (linhagem MCF-7) e pulmão (linhagem H1299), foi realizado um estudo com o inibidor específico de SIRT1, SIRTINOL, a fim de verificar o seu efeito na parada do ciclo celular. O tratamento com SIRTINOL inibiu o crescimento de ambas as linhagens e foi persistente até 9 dias após a retirada da droga. Verificou-se também um aumento na expressão de fatores como SA- β -gal e PAI-1, aumentados na célula em parada no ciclo celular.(61)

Vários genes supressores tumorais são silenciados no processo de desenvolvimento de tumores através da promoção anormal da metilação do DNA (domínio da metilação do DNA sobre a desacetilação histonas para manter o gene silenciado). Inibidores de histonas desacetilases estão sendo amplamente testados em Oncologia, porém inibidores específicos de sirtuínas ainda não. Com o intuito de verificar se SIRT1 possuía algum papel em silenciar genes supressores tumorais, foi desenvolvido um estudo utilizando linhagens de células tumorais de mama e cólon. Mecanismos utilizados para

inibir a SIRT1: infecção retroviral, inibidores gerais de sirtuinas (NICOTINAMIDA –NIA), inibidor específico de Sir 2 (SPLITOMICINA-SPT) e inibidor SIRT1 inativo cataliticamente (SIRT1H363Y). Através da inibição do gene de SIRT1 pode-se ressaltar:

- a partir da supressão de SIRT1 houve um aumento na expressão dos genes supressores tumorais SFRP1 e SFRP2 (inativos no câncer de mama e cólon);

- SIRT1 silencia o gene *E-cadherin* (mantém adesão celular);

- SIRT1 silencia o gene de reparo de erro MHL1 – promove instabilidade microsatélite em câncer de cólon;

Assim, a partir da supressão de SIRT1 houve reexpressão genética de genes supressores tumorais, restauração de *E-cadherin* e MHL1 e apoptose de células cancerígenas, sugerindo que, por outro lado, o aumento da sua expressão está relacionado à oncogênese. Terapias envolvendo agentes desmetiladores de DNA e inibidores histonas classe I/II e sirtuinas constituem potencial terapêutico em restaurar a expressão de genes silenciados em câncer.(62)

O composto SAHA é o inibidor de HDAC classe I e II mais estudado e já completou estudo de fase II. Nos estudos de fase I, a resposta foi modesta, sendo encontrada apenas 1 resposta parcial e 1 resposta completa em 39 pacientes. Nenhum efeito adverso maior foi encontrado nos pacientes que receberam SAHA via oral em comparação com endovenosa. Este estudo de fase II incluiu pacientes com linfoma células T cutâneo refratário a tratamento e formas agressivas de linfoma não-Hodgking. O estudo publicado em 2005 apresentou resposta parcial em 8 de 33 pacientes. Novos estudos incluindo linfomas de células B, mieloma múltiplo, mesotelioma, câncer de mama e colorretal estão sendo realizados.(63)

Assim, vários estudos demonstram o papel de SIRT1 em regular uma série de eventos celulares: mecanismo antiapoptose, proteção neuronal, restrição calórica, metabolismo da glicose, depósito gordura, secreção de insulina, envelhecimento celular e inibição do gene p53. A superexpressão da SIRT1 em células cancerosas comparadas com células normais sugere o papel

da SIRT1 na carcinogênese. Novos estudos envolvendo outros tipos de células tumorais devem surgir para esclarecer o real papel de SIRT1 na oncogênese e então aplicar este conhecimento para novos alvos terapêuticos.(64)

2.5 CÂNCER DE ENDOMÉTRIO

2.5.1 Epidemiologia , fatores de risco e diagnóstico

O câncer de endométrio é uma das neoplasias mais prevalentes em mulheres em idade avançada. O aumento da expectativa de vida observado nas últimas décadas ressaltou a importância da identificação desta enfermidade. No Rio Grande do Sul, segundo as estatísticas de mortalidade da Secretaria de Saúde do estado, as neoplasias malignas do útero porção não-especificada (CID C55) foram responsáveis por 0,5% dos óbitos na população feminina em 2006.(65)

As mulheres na pós-menopausa são mais comumente atingidas (60 a 70% das mulheres com câncer de endométrio), sendo a idade média superior a 58 anos. Aproximadamente 90% das mulheres apresentam hemorragia ou corrimento vaginal como sintomatologia, sendo alguns sintomas como dor abdominal um indicativo de doença extra-uterina. Qualquer sangramento anormal na peri-menopausa e na pós-menopausa deve ser investigado. O papel do estrogênio no desenvolvimento da maioria destas neoplasias é bem estabelecido e qualquer fator que aumente a exposição aos estrogênios sem oposição da progesterona aumenta o risco de câncer de endométrio (quadro 1).(66, 67)

Quadro 1 – Fatores de risco para o câncer de endométrio

FATORES DE RISCO	INCIDÊNCIA
Idade acima de 60 anos	X 5
Obesidade	
15- 25 kg	X 3
>25 kg	X 10
Diabete melito	X 2,8
Hipertensão arterial	X 1,5
Nuliparidade	X 2-3
Menopausa tardia (>52 anos)	X 2,4
Antecedentes familiares	AUMENTADA
Estrogenioterapia sem oposição	X 2
Tamoxifeno	X 5
Hiperplasia atípica	X 8

*Adaptado de Halbe-Tratado de Ginecologia (67)

Os estágios hiperplásicos constituem um fator de risco importante no desenvolvimento da neoplasia de endométrio. O risco da hiperplasia de endométrio progredir para carcinoma de endométrio está relacionado à presença e à intensidade da atipia citológica. O risco de progressão para carcinoma ocorre em 8% nas hiperplasias simples com atipias e em 29% nas hiperplasias complexas com atipias. (66) Vários métodos foram desenvolvidos para rastreamento e diagnóstico desta neoplasia como a ultra-sonografia transvaginal, histerossonografia, citologia endometrial, curetagem e histeroscopia com biópsia. A histeroscopia com biópsia atualmente constitui o padrão ouro na identificação de patologias endometriais por proporcionar a visualização direta da cavidade uterina com retirada de amostra histológica.(67)

2.5.2 Histopatologia e alterações moleculares

Do ponto de vista histopatológico, os tumores de endométrio podem ser divididos em duas categorias: 1) neoplasias resultantes do excesso de estrogênios (pacientes com fatores de risco como obesidade, diabetes, hipertensão, anovulação crônica, uso de estrogênio por longa data, uso de tamoxifeno, presença de lesões hiperplásicas endometriais prévias); 2) neoplasias não dependente de hormônios (mais raro). A maioria dos tumores é do tipo adenocarcinoma endometrióide (80%) divididos em grau I (bem diferenciados, 50%), grau II (moderadamente diferenciados, 35%) e grau III (pouco diferenciados, 15%), baseados no padrão arquitetural e nuclear. A invasão miometrial está diretamente relacionada ao grau do tumor e a extensão para cérvix ocorre em aproximadamente 10% dos casos. Existe um grande número de variantes histológicas e outros subtipos, sendo os mais relevantes descritos no quadro 2. (68)

Entre as alterações moleculares encontradas, existem diferentes mecanismos patogênicos envolvidos nos 2 tipos principais de tumores:

1. Endometrióides: presença de instabilidade microsatélite e mutações nos genes PTEN, K-ras, β -catenina, MLH1
2. Não-endometrióides (principalmente tumores serosos): mutações no gene p53 e perda da heterozigossidade em vários cromossomos, her2, p16, E-cadherin. (68), (69)

Aproximadamente 20% dos tumores endometrióides esporádicos exibem instabilidade microsatélite e inativação do gene MHL1 (sistema de reparo de erro), o que ocorre através da hipermetilação das *CpGs islands*, um processo denominado de silenciamento genético. A inativação do gene supressor tumoral PTEN é visto em aproximadamente 80% dos tumores endometrióides e parece ser um evento precursor. Instabilidade cromossômica e mutação no gene p53 são encontradas nos tumores serosos. Estas alterações moleculares distintas também estão associadas a diferentes fatores prognósticos (os tumores serosos tendem a ser mais agressivos e com pior prognóstico). (70)

Quadro 2- Tipos histológicos e variantes histológicas das neoplasias de endométrio

TIPO HISTOLÓGICO	CARACTERÍSTICAS
Adenocarcinoma Endometrióide	Elementos tumorais que lembram aspecto de endométrio não-neoplásico. Maioria dos tumores (80%).
Adenoacantoma	Elementos escamosos derivados de metaplasia de glândulas tumorais.
Adenoescamoso (Misto)	Tumor endometrióide contendo elementos escamosos de aspecto tumoral. Incidência pode chegar a 30%.
Secretor	Glândulas neoplásicas com vacuolização subnuclear que lembram aspecto secretor.
Ciliado	Variante extremamente rara do tipo endometrióide composto por células ciliadas – deve ser diferenciada de metaplasia ciliar (mais comum).
Mucinoso	Abundante secreção de mucina.
Viloglandular	Padrão papilar focal, tanto na superfície quanto na área invasora.
Papilar Seroso	Tumor altamente agressivo semelhante ao tumor seroso de ovário. Caracterizado por um padrão papilar de crescimento, alto grau de atipias, numerosas mitoses, áreas de necrose e invasão miometrial.
Células Claras	Composto por células claras, contendo grande quantidade de glicogênio.
Escamoso	Encontrado na forma pura é extremamente raro. Distinguir entre tumor primário e extensão de carcinoma cervical.
Sarcoma de estroma endometrial	Composto por células pequenas, uniformes, que lembram o estroma endometrial, envoltas por fibras reticulares, com arranjo concêntrico ao redor de pequenas arteríolas. Divididos em baixo e alto grau de acordo com o número de mitoses por campo de alto aumento (< ou > 10). Tumores de progressão lenta e alta recidiva.
Tumor mülleriano misto maligno (carcinossarcoma)	Forma polipóide envolvendo endométrio e miométrio. Aspecto tumoral misto entre carcinoma e sarcoma (padrão glandular e mesenquimal). Tumores pouco diferenciados e agressivos.

* Adaptado de Rosai (68)

O endométrio é um tecido hormônio-dependente que possui duas camadas, a camada basal e a funcional. A camada funcional sofre alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais; através de processos de proliferação, diferenciação, quebra de tecido (menstruação e reparo do tecido). As alterações cíclicas do endométrio dependem basicamente dos hormônios esteróides, principalmente estrogênio e progesterona, atuando através de seus respectivos receptores na fisiologia e no desenvolvimento de patologias no endométrio. Receptores esteróides (RE, RP e RA) podem ser diretamente modificados por quinases, histonas acetiltransferases e modificadores ubiquitin-like, que atuam alterando a ligação de DNA, a atividade de transcrição e a sensibilidade aos hormônios. Os hormônios esteróides atuam como fatores que comandam a transcrição de genes alvo. A regulação dos genes de transcrição por parte dos hormônios necessita de outras proteínas chamadas de co-reguladores, que se ligam para modular a expressão gênica. Co-ativadores são fatores que recrutam proteínas que atuam na ligação entre hormônios e gene alvo ou que atuam na modificação das histonas. Co-repressores são fatores que impedem a ligação hormônio-alvo ou que recrutam histonas desacetilases com o intuito de suprimir a expressão gênica. DNA metiltransferases, proteínas de metil CpG, histonas acetiltransferases (HATs), histonas desacetilases (HDACs), histonas metiltransferases (HMTs) e histonas metildesacetilases (HDMs) estão presentes no endométrio, mas a compreensão de todos estes fatores, bem como a aplicabilidade clínica disto, ainda está para ser definida.(71)

2.5.3 Estadiamento e tratamento cirúrgico

O estadiamento do Câncer de Endométrio desde 1988 passou a ser cirúrgico, a partir de vários estudos que demonstraram que a informação obtida na cirurgia era um fator importante para prognóstico e sobrevida. Em 2009, houve atualização do estadiamento (quadro 3).

Quadro 3 – Estadiamento cirúrgico do câncer de endométrio – FIGO 2009

ESTADIAMENTO	DESCRIÇÃO
I. Tumor limitado ao corpo	I A: tumor limitado ao endométrio I B: invasão de menos da metade do miométrio I C: invasão de mais da metade do miométrio
II. Tumor invade a cérvix	Tumor invade estroma cervical (envolvimento glandular cervical é estágio I)
III. Tumor além do útero, restrito à pelve	III A: invasão da serosa e/ou anexos e/ou citologia peritoneal positiva III B: invade vagina ou paramétrio III C1: metástases linfonodos pélvicos III C2: metástases linfonodos paraórticos
IV. Invasão órgãos vizinhos e/ou metástases à distância	IV A: invasão de bexiga e/ou mucosa do intestino IV B: metástases à distância, incluindo metástases intrabdominais e /ou linfonodos inguinais

Adaptado de FIGO- Committee on Oncology Gynecology (72)

Estudos realizados pelo grupo GOG americano (*Gynecology Oncology Group*) demonstraram os principais fatores prognósticos uterinos (tipo celular, grau tumoral, profundidade da invasão miometrial, extensão para cérvix, invasão do espaço vascular) e extrauterinos (metástases anexiais, disseminação pélvica, citologia peritoneal positiva, metástases em linfonodos pélvicos e paraaórticos).(73) A fim de reconhecer todos estes fatores, é necessário realizar laparotomia exploradora, citologia do líquido peritoneal, histerectomia total extrafascial, anexectomia bilateral, linfadenectomia ilíaca e

paraaórtica. A linfadenectomia tem sido proposta quando há invasão de mais da metade do miométrio; invasão para cérvix, anexos ou outras metástases pélvicas; tumores serosos, de células claras, indiferenciados, escamosos e/ou na presença de linfonodos aumentados (visíveis ou palpáveis). A grande maioria dos ginecologistas generalistas não realiza linfadenectomia e acaba submetendo o paciente a tratamento radioterápico complementar com base nos fatores prognósticos do tumor, o que ocorre em um percentual menor quando o procedimento é realizado por um ginecologista oncologista. (74)

Em uma revisão dos casos de câncer de endométrio de 1993 a 2004 no *Memorial Sloan Kettering Center, New York*, verificou-se que após a entrada do hospital em um trabalho do *Gynecology Oncology Group (GOG)* que comparava linfadenectomia por videolaparoscopia versus laparotomia, houve um aumento significativo no número de pacientes submetidos à linfadenectomia (28% em 1993 comparado a 82% em 2004, $p < 0,001$), o que resultou em diminuição no uso de radioterapia pós-operatória (16% entre 1993-1998 *versus* 9% entre 1999-2004). O uso de radioterapia interna (braquiterapia) e a sobrevida não sofreram modificações. A realização de um estadiamento completo acaba garantindo a informação correta sobre a extensão da doença e o seu prognóstico, o que auxilia na melhor terapêutica adjuvante.(74)

Em uma análise sobre os procedimentos cirúrgicos realizados no tratamento do câncer de endométrio no Japão, a partir dos relatos de membros do GOG, verificou-se que 139 instituições responderam ao questionário, destas, 97,8% (136) realizam linfadenectomia pélvica de rotina para todos os pacientes, uma instituição realiza baseada em fatores do tumor (grau 3 e invasão de mais da metade do miométrio) e 2 instituições não realizam linfadenectomia. A maioria realiza apenas histerectomia abdominal total (35,3%), sendo 30,2 % cirurgia de PIVER II (histerectomia total ampliada) e 34,5 % histerectomia radical (de rotina ou baseada na invasão cervical). A utilização de invasão miometrial, aumento linfonodos paraaórticos (em exame de imagem ou no transoperatório) e grau 3 foram citados como critérios para realização de linfadenectomia paraaórtica.(75)

Apesar da recomendação da realização de estadiamento cirúrgico completo, o uso sistemático de linfadenectomia pélvica e paraaórtica em todas

as pacientes não têm sido amplamente aceito em virtude da morbidade do procedimento e dos efeitos adversos com a radioterapia adjuvante. Deste modo, em recente revisão sobre as estratégias de tratamento do câncer de endométrio na *Mayo Clinic* (EUA) as recomendações para a não realização de linfadenectomia são tipo endometrióide grau 1 ou 2, invasão de menos da metade do miométrio, tumor menor de 2 cm, sem evidência de tumor fora do útero. Na presença de histologia não-endometrióide (tipo histológico seroso, células claras) deve-se realizar linfadenectomia e acrescentar omentectomia e biópsias peritoneais randomizadas.(70)

Com o intuito de auxiliar na identificação de critérios para realização de linfadenectomia, outro estudo japonês desenvolveu um escore de risco pré-operatório para metástase linfonodais utilizando o índice de volume (a partir das medidas uterinas), o valor sérico CA-125 e o grau/histologia do tumor. Estes parâmetros foram avaliados a partir de um estudo piloto utilizando 214 casos de carcinoma de endométrio submetidos à linfadenectomia pélvica e paraaórtica no período de janeiro de 1993 a março de 2000.(76). Os valores determinados para maior risco foram: volume acima de 36, CA-125 acima de 70U/ml (pacientes com idade inferior a 50 anos) ou 28U/ml (pacientes com idade igual ou superior a 50) e grau /histologia compatível com grau 3/ tumor seroso. Para validação do escore, 211 pacientes no período de julho de 2000 a abril de 2005 foram submetidas à ressonância magnética pré-operatória, CA-125 e biópsia de endométrio e, posteriormente, à cirurgia completa (panhisterectomia e linfadenectomia pélvica e paraaórtica). As pacientes foram estratificadas em baixo risco para metástase linfonodais (sem fatores de risco), risco intermediário (um fator), alto risco (dois fatores) e altíssimo risco (três fatores). De acordo com este escore, as taxas de metástases em linfonodos pélvicos e paraaórticos foram, respectivamente: 3,2% e 1,0% nas pacientes com baixo risco; 15,3% e 11,9% nas com risco intermediário; 23,3 % e 23,8 % nas com alto risco; e 71,4% e 57,1% nas com altíssimo risco. Os autores sugerem que este escore pode auxiliar na exclusão de linfadenectomia paraaórtica nos casos de pacientes com baixo grau no escore proposto.(77)

2.5.4 Tratamento complementar

A maioria das pacientes apresenta doença em estádios precoces, sendo o tratamento cirúrgico eficaz, com uma sobrevida em 5 anos acima de 70%. Pacientes com tumores de alto grau, invasão profunda miométrio, extensão para cérvix, metástases para linfonodos e doença extra-uterina apresentam maior risco de recidiva sendo indicado tratamento radioterápico adjuvante. (11) O tratamento padrão consiste em radioterapia externa seguida de braquiterapia vaginal e possui papel na melhora do controle local da doença sem alterar a sobrevida. Há 4 potenciais rotas de metástases baseadas no acometimento tumoral de acordo com revisão de casos realizada na *Mayo Clinic*: 1) invasão miometrial profunda - metástase hematogênica; 2) linfonodos positivos e invasão estroma cervical – recorrência linfonodal; 3) grau 3, invasão espaço vascular ou ambos – recorrência vaginal; 4) estágio IV ou vários fatores combinados – recorrência pélvica. Baseado nos riscos define-se: braquiterapia para pacientes com risco de recorrência vaginal; radioterapia externa para pacientes com risco de recidiva linfonodal; quimioterapia para pacientes com risco de metástases hematogênicas e recorrência pélvica; e terapia combinada para pacientes com vários fatores de risco.(70)

A quimioterapia tem sido utilizada na doença avançada ou recorrente, e possui um papel limitado. Os agentes comumente utilizados incluem a cisplatina e doxorubicina, mas os efeitos colaterais muitas vezes não são tolerados e os pacientes apresentam muitas comorbidades. Em 2007 foi publicada uma metanálise incluindo ensaios clínicos randomizados a fim de verificar o impacto dos agentes quimioterápicos na sobrevida livre de doença, na melhora da qualidade de vida e sobrevida global. Onze ensaios clínicos foram selecionados, todos comparando uma droga com outra, nenhum comparando contra hormonioterapia ou medidas de suporte. Seis estudos foram utilizados na metanálise que verificou uma melhora significativa na sobrevida livre de doença (HR= 0,80 IC95% 0,71 – 0,90) com o uso de quimioterapia mais intensa em comparação com regimes mais leves. O uso de doxorubicina e cisplatina em combinação com outras drogas demonstrou uma melhora na sobrevida global quando comparada com doxorubicina e cisplatina isoladas (este resultado se deve principalmente a um trabalho que associou

Paclitaxel ao esquema). Não há evidências suficientes quanto ao controle de sintomas e melhora na qualidade de vida. Os autores concluem que platinas, antracicilinas e taxanos são as drogas mais estudadas e que o uso combinado melhora as taxas de resposta apesar do aumento de efeitos adversos (mielossupressão e gastrointestinais). Estes autores sugerem que outros estudos devam ser realizados comparando os agentes quimioterápicos com hormonioterapia e verificando adequadamente o impacto destes agentes sobre a qualidade de vida.(11)

Em virtude da maioria das pacientes com doença recorrente ou estágios avançados da doença ser composta de mulheres idosas, os regimes de quimioterapia muitas vezes são limitados pela toxicidade. A hormonioterapia com progestágenos é menos tóxica e possui taxas de resposta de até 20% em pacientes selecionados. As taxas de resposta com agentes quimioterápicos são em torno de 20-30% e são mais eficazes nas terapias combinadas do que com agentes isolados.(70)

2.6 IMUNOHISTOQUÍMICA NO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO

Os dois tipos histológicos mais estudados de carcinoma de endométrio são o endometrióide e o seroso, exibindo comportamento biológico distintos, sendo os tumores serosos mais agressivos. Uma forte imunorreatividade de p53 é vista em 80% dos tumores serosos, sendo encontrada em apenas 20% dos tumores endometrióides.(78) A expressão de p53 em tumores endometrióides é negativa a fraca nos graus 1 e 2. Este resultado confirmado por análise molecular demonstrou que mutações no gene p53 ocorrem na maioria dos tumores serosos (90%) e em apenas 10-20% dos tumores endometrióides, sendo ainda encontradas nos tumores de maior grau. Uma vez que tumores endometrióides grau 3 expressam p53 e 10-15% dos tumores serosos não expressam, o uso deste marcador não é recomendado na diferenciação deste tumores. Marcadores adicionais devem ser utilizados como MIB1, RE/RP, beta-catenina e PTEN. MIB1 deve ser utilizado na suspeita de tumor seroso e na ausência de expressão de p53 (>75% de expressão de MIB1 é compatível com tumor seroso). A expressão de RE/RP é prevalente nos

tumores endometrióides grau 1 e 2 e fraca ou ausente nos tumores serosos, células claras e endometrióide grau 3. Acúmulo nuclear de beta-catenina é visto em 35-50% dos tumores endometrióides, em contraste com padrão membranoso dos tumores serosos. Ao contrário da p53, cuja expressão aumenta na maioria das mutações, mutações no gene PTEN resultam em diminuição da expressão imunohistoquímica comparada com tecido normal. A perda de PTEN é comum nos tumores endometrióides e raramente é vista nos tumores serosos.(79, 80)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Verificar a expressão da enzima SIRT1, p53 e receptores hormonais (RE: receptor de estrogênio / RP: receptor de progesterona) em amostras histológicas de carcinoma de endométrio de pacientes operadas no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) no período de janeiro de 2000 a junho de 2012 e compará-la com a sua expressão em amostras de pacientes com endométrio sadio (secretor, proliferativo e atrófico) obtidas em biópsias ou cirurgias (ex: prolapso genital) realizadas no mesmo período.

3.2 OBJETIVO SECUNDÁRIO

Verificar se existe diferença na expressão de SIRT1, p53, RE e RP de acordo com as principais características histológicas do tumor (grau, tipo histológico, estadiamento).

4 ARTIGO EM PORTUGUÊS

**EXPRESSÃO DA ENZIMA SIRT 1, p53 E RECEPTORES
HORMONAIS (RE / RP) NO ENDOMÉTRIO NEOPLÁSICO E SADIO**

**EXPRESSÃO DA ENZIMA SIRT1, p53 E RECEPTORES HORMONAIS
(RE/RP) NO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO**

***SIRT1 ENZYME, p53 AND HORMONE RECEPTORS
(ER/PR) EXPRESSION IN ENDOMETRIAL CANCER***

Chrystiane da Silva Marc¹
Julia de Gasperi³
Luciana Cioffi³
Francisca Indrusiak³
Tiago Giuliani Lopes⁴
Vinícius Duval da Silva²

Correspondência para:

Dra. Chrystiane da Silva Marc, Rua Campos Sales nº90 apto 702
90480-030, Porto Alegre, RS - Brasil.
Tel: +55 51 99810668; e-mail: chrystianem@yahoo.com

¹ Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul

² Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do
Sul, Hospital São Lucas

³ Acadêmicas da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul

⁴ Técnico em histologia do Laboratório de Patologia do Hospital São Lucas da
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

RESUMO

Introdução – Estudos recentes têm demonstrado que as histonas, proteínas da estrutura da cromatina, exercem um papel importante na expressão gênica. Modificações como acetilação, desacetilação e fosforilação de histonas podem resultar em um aumento ou repressão de genes de transcrição. Um desbalanço nestes sistemas pode levar ao desenvolvimento de diversas doenças, incluindo câncer. A *Sirtuina 1* (SIRT1) pertence a família de histonas desacetilases NAD – dependentes e está envolvida com a regulação da ativação da transcrição e apoptose relacionada ao gene p53 (gene supressor tumoral). Há várias alterações na expressão de receptores hormonais e p53 em câncer de endométrio, mas o papel de SIRT1 nestes tumores ainda está para ser definido.

Objetivos - Identificar, quantificar e comparar a expressão da enzima SIRT1, p53 e receptores hormonais de estrogênio (RE) e progesterona (RP) em amostras de endométrio tumoral e normal.

População e Métodos – Estudo de caso-controle comparando 96 casos de câncer de endométrio e 128 controles (endométrio sadio) a partir de amostras do banco de dados do Setor de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS no período de janeiro de 2000 a junho de 2012. Os espécimes em parafina foram submetidos à pesquisa dos fatores em estudo através da técnica de imunohistoquímica.

Resultados – A expressão de SIRT1 avaliada pelo percentual médio de positividade nuclear de células foi significativamente maior nos tumores em comparação com os controles, ao passo que a expressão de RE e RP foi maior no endométrio sadio. Não houve diferença na expressão de p53 entre casos e controles. Os tumores mais agressivos (maior grau e estadiamento III-IV) tiveram redução significativa na expressão de RP.

Conclusão – A expressão de SIRT1 foi maior nos tumores de endométrio, sugerindo um possível alvo terapêutico.

Palavras-chave – Câncer de endométrio, SIRT1, histonas desacetilases, receptores hormonais, p53.

ABSTRACT

Background – Recent studies have demonstrated that the chromatin structure proteins named histones have an important role in gene expression. Acetylation, deacetylation and fosforylation of such proteins may result in upregulation or repression of transcription genes. An imbalance of these systems may result in the development of many diseases, including cancer. Sirtuin 1 (SIRT1) is a member of the family of histone deacetylases NAD – dependents and is involved in the regulation of transcription and apoptosis activation related to p53 gene. There are several changes in the expression of hormone receptors and p53 in endometrial cancer, but the role of SIRT1 in these tumors is still to be defined.

Objective - To identify, quantify and compare SIRT1, p53, estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) expression in normal and neoplastic endometrial tissue.

Methods – Case-control study comparing 96 cases of endometrial cancer and 128 control samples comprised of normal endometrium. All samples were selected from the Pathology Service, Hospital Sao Lucas of PUCRS between January, 2000 and June, 2012. The factors studied in this paper were analyzed in paraffin specimens by immunohistochemistry technique.

Results – Expression of SIRT1 was assessed by the mean percentage of cells with positive nuclear staining was higher in the cancer group as compared to the control group. Expression of ER and PR was higher in the normal endometrium. There is no difference between case and control groups regarding the expression of p53. More aggressive cancers (high grade and stage III-IV) have a reduction on the expression of PR.

Conclusion – The immunohistochemical expression of SIRT1 histone deacetylase was significantly higher in endometrial cancer samples, suggesting a possible new target therapy.

Keywords – Endometrial cancer, SIRT1, histone deacetylases, steroids receptors, p53

INTRODUÇÃO

A cromatina constitui-se de complexos de DNA associados a proteínas estruturais denominadas histonas e não-histonas. Sabe-se que a estrutura da cromatina exerce um papel importante na expressão gênica e que modificações como acetilação, desacetilação e fosforilação de histonas podem levar a mudanças na arquitetura de nucleossomos e remodelamento da cromatina, o que pode resultar em um aumento ou repressão de genes de transcrição.(1) As duas modificações mais estudadas são a acetilação e a desacetilação de lisinas em histonas do núcleo, que são controladas por enzimas denominadas de histonas acetiltransferases (HAT) e histonas desacetilases (HDAC).(2)

Alguns padrões de expressão genética das células resultam do balanço entre a atividade de histonas acetiltransferases e histonas desacetilases. Um desbalanço na acetilação de histonas está relacionado com o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo câncer.(3) (4) Existem atualmente descritas 3 classes de desacetilases: 1) classes I/II: relacionadas a locais específicos na cromatina e que atuam através de um mecanismo de acetilação Zinco – dependente; 2) classe III ou *sirtuinas*: estruturalmente e mecanicamente distintas das outras classes, atuam através de um mecanismo nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) – dependente.(5) (6)

Dentre as sirtuinas, a enzima Sir 2 (*silent information regulator 2*), localizada no núcleo, foi descrita no fungo *Saccharomyces cerevisiae* e possui importante papel no silenciamento de transcrição genética através de 3 loci específicos: telômeros, DNA ribossomal e locus de silenciamento.(7) Observou-se que na superexpressão de Sir 2 havia uma desacetilação de histonas, o que caracteriza a enzima Sir 2 como uma histona desacetilase.(8) A Sir 2 possui um mecanismo NAD dependente: para cada lisina desacetilada, uma molécula de NAD é clivada e produz nicotinamida e O-acetyl-ADP-ribose. Este último composto tem sido proposto como um importante sinalizador ou cofator para a atividade catalítica do efeito silenciador do gene Sir 2.(9)

A Sirtuina 1 (SIRT1) pertence a família de enzimas Sir 2 de histonas desacetilases NAD – dependentes encontrada em mamíferos. A desacetilação promovida por SIRT1 parece estar envolvida com a regulação da ativação da transcrição e apoptose relacionada ao gene p53 (gene supressor tumoral). Ainda, em células sob estresse, SIRT1 promove sobrevivência celular por inibir a apoptose dependente de p53. A SIRT1 parece modificar a cromatina diretamente, silenciar a transcrição gênica, modular o checkpoint meiótico e promover um efeito antienvhecimento. O gene SIRT1 localiza-se no cromossomo humano 10q21.3.(8, 10, 11)

Vários estudos demonstram o papel de SIRT1 em regular uma série de eventos celulares: inibição do gene p53, mecanismo antiapoptose, restrição calórica, metabolismo da glicose, depósito gordura, secreção de insulina, envelhecimento celular, atuação no gene supressor tumoral HIC1, inibição da expressão de receptores androgênicos, entre outros.(10, 12-15) A superexpressão de SIRT1 em células cancerosas comparadas com células normais sugere um possível papel de SIRT1 na carcinogênese.(16)

O câncer de endométrio é uma das neoplasias mais prevalentes em mulheres na pós-menopausa. O aumento da expectativa de vida observado nas últimas décadas ressaltou a importância da identificação desta enfermidade. A maioria das pacientes no momento do diagnóstico apresenta a doença em estádios precoces, sendo o tratamento cirúrgico eficaz. Pacientes com tumores de alto grau, invasão profunda miométrio, extensão para cérvix, metástases para linfonodos e doença extra-uterina apresentam maior risco de recidiva sendo indicado tratamento radioterápico adjuvante. A quimioterapia tem sido utilizada na doença avançada ou recorrente, e possui um papel limitado.(17)

Dessa forma, o tratamento desta doença é basicamente cirúrgico, sendo a radioterapia um tratamento complementar e a quimioterapia um tratamento de resgate com resultados pobres, tornando-se necessária a pesquisa de novas alternativas terapêuticas. Um novo enfoque em oncologia tem sido a busca de moléculas que possam ser alvo de terapia com anticorpos monoclonais. Vários agentes que alteram a metilação do DNA ou modificam as histonas têm sido propostos como novas drogas terapêuticas e seu uso vem

sendo testado em vários trabalhos. Inibidores de histonas desacetilases (IHDAC) estão envolvidos em estudos de fase I e II e são capazes de induzir a diferenciação celular, parada no ciclo celular ou apoptose em tumores.(18)

Com o intuito de encontrar um possível alvo terapêutico em câncer de endométrio, buscamos identificar, quantificar e comparar a expressão da enzima SIRT1 (histona desacetilase) em amostras de endométrio tumoral e normal, bem como a expressão de receptores hormonais e p53.

PACIENTES E MÉTODOS

Foi realizado um estudo de caso-controle comparando a expressão da enzima SIRT1, receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e p53 em amostras histológicas adquiridas através do bloco de parafina de pacientes com tumores malignos de endométrio (casos) e em endométrio considerado normal (controles), com projeto aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da instituição.

As amostras de neoplasia (casos) foram obtidas a partir de pacientes submetidas a tratamento cirúrgico (histerectomia, anexectomia bilateral com ou sem linfadenectomia pélvica) no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), sendo resgatados todos os casos de anatomopatológicos de câncer de endométrio realizados no período de janeiro de 2000 a junho de 2012 que possuíam amostra tecidual em bloco de parafina nos arquivos do Serviço de Patologia dessa instituição. Os dados dos anatomopatológicos foram tabulados e analisados de acordo com: tipo histológico, grau, tamanho do tumor, margem cirúrgica, avaliação de linfonodos, invasão de outros órgãos e estadiamento cirúrgico segundo a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) 2009. (19)

As amostras histológicas não-neoplásicas (controles) foram obtidas de pacientes submetidas à biópsia de endométrio (por qualquer razão, por exemplo, menorragia) ou a procedimentos cirúrgicos (exceto por patologia endometrial) que foram realizadas no mesmo hospital e no mesmo período dos casos. Foram incluídas amostras com resultado histológico normal (endométrio

atrófico, proliferativo e secretor) excluindo-se além de neoplasia, as lesões hiperplásicas e o desenvolvimento de alguma alteração neoplásica ou pré-neoplásica documentada posteriormente à biópsia.

Foram incluídos inicialmente no estudo 100 casos de câncer de endométrio e 130 controles. Algumas amostras foram excluídas por falta de material (blocos de parafina) ou impossibilidade de realizar a técnica de imunohistoquímica. A amostra final foi constituída de 96 casos e 128 controles (total de 224).

Cada amostra (casos e controles) teve a expressão de SIRT1 , RE, RP e p53 definida a partir da análise histológica dos espécimes submetidos à técnica de imunohistoquímica.

Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica foi realizada em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina utilizando os anticorpos dos fatores em estudo. O mecanismo de detecção utilizado para pesquisa de antígenos em tecidos foi através de método de polímero.

Para o preparo das lâminas e posterior análise imunohistoquímica, foram feitas secções de 3um de espessura, obtidas com o auxílio de um micrótomo (Leica, SM 2000R, Alemanha). Os cortes foram colocados em lâminas com carga positiva (FLEX IHC Microscope Slides, Dako) e levados à estufa a 60°C por 24h.

A exposição do antígeno, através da metodologia de recuperação antigênica induzida por calor à alta temperatura, foi realizada em plataforma pTLINK (DAKO) por 15minutos á 98°C, com a solução Envision Flex solução de recuperação antigênica, pH alto (DAKO). Logo após este período, foi realizada a lavagem das lâminas em tampão PBS, pH 7.2. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de 3% de H2O2 em álcool metílico em duas incubações de 15 minutos seguido de três ciclos de lavagem com tampão PBS, pH7.2.

Os cortes foram incubados pela metodologia de capilaridade através da estação de imuno-coloração Sequenza (Thermo Shandon, USA) por 20

minutos em temperatura ambiente para os seguintes anticorpos: Receptor de Estrógeno, clone 1D5 (RTU Flex, Dako), Receptor de Progesterona, clone PgR636 (RTU Flex, Dako), proteína p53, clone DO-7, (RTU Flex, Dako) e para a SIRT-1, clone E104 (ABCAM 32441) utilizou-se a diluição de 1:100 diluído em tampão PBS e incubado overnight entre 5–6C^a. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados por 3 passagens de tampão PBS, pH7.2. Para amplificação da reação antígeno-anticorpo utilizou-se o sistema de detecção cromogênica Envision™ FLEX, High pH(Dako,USA) utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. A seguir, as lâminas foram lavadas com tampão PBS, pH7.2 e incubadas com solução de diaminobenzidina (Dako Liquid DAB Substrate Chromogen System, USA) por 5 minutos. Após lavagem em água destilada, as lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto seguido de lavagem em água corrente até remoção completa do corante e incubadas em um solução de amônia 37mM por 15 segundos. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas em álcool etílico absoluto (quatro incubações de 2 minutos) e após dois tratamentos com xileno por 5 minutos. As lâminas foram montadas com meio sintético Entellan (Merck, Alemanha).

Método de Contagem

Para a realização da contagem celular foi utilizado um sistema de análise digital composto por microscópio óptico Zeiss Axioskop 40 com lentes neofluares (Oberkochen, Alemanha), conectado através de uma videocâmera *Roper Scientific (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA)* a um microcomputador (Pentium IV 2.2 GHz com 1024 MB de memória RAM, disco rígido de 160 GB) e placa de captura *Image Pro Capture kit (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA)*. Para a captura digital das imagens foi utilizado o programa *Image Pro Plus* versão 6.0. As imagens foram capturadas no formato TIFF (*True Image Format File*). Foi realizada análise de 5 campos de 400 aumentos para cada amostra, constituindo um total de 1120 campos analisados (cada área de 400 aumentos corresponde a 19200 µm²). As células positivas para expressão de qualquer um dos marcadores utilizados foram

identificadas pela coloração nuclear marrom, obtendo-se então, um percentual médio de expressão de SIRT1, RE, RP e p53 para cada amostra, incluindo na contagem células glandulares e do estroma. O processo de análise das imagens foi realizado de forma automática por um software desenvolvido especialmente para esta pesquisa. O método de contagem das células que coraram ao marcador no processo de imunohistoquímica foi realizado basicamente em duas etapas: separação dos núcleos celulares do restante da imagem e identificação da tonalidade marrom através da aplicação de sucessivos filtros de cores. O percentual de células consideradas positivas foi determinado através do total de células na tonalidade marrom dividido pelo total de células da imagem.

Análise Estatística

Os dados quantitativos foram descritos por média e desvio-padrão ou por mediana e amplitude interquartil (P25 a P75) quando as pressuposições de distribuição gaussiana não foram atingidos. Dados categóricos foram descritos por contagens e percentuais. A comparação da expressão dos marcadores foi realizada pelo teste de Mann-Whitney no caso de dois grupos e pelo teste de Kruskal-Wallis quando 3 ou mais grupos estavam envolvidos. Comparações post-hoc após o teste de Kruskal-Wallis foram ajustadas pelo procedimento de Holm-Bonferroni. Letras-índice foram utilizadas para designar diferenças estatisticamente significativas. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram processados e analisados com os programas SPSS versão 22 e WinPepi versão 10.5.

RESULTADOS

Os controles foram compostos de 128 amostras (51 casos de endométrio proliferativo, 50 casos de endométrio secretor e 27 casos de endométrio atrófico) de pacientes com média de idade de 47,5 anos (desvio-padrão 10,2 anos). Os casos foram constituídos das amostras de câncer de

endométrio de pacientes com média de idade de 65,7 anos (desvio-padrão de 10,3 anos) - Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição da amostra (n=224)

GRUPOS	N	Idade (anos)
Casos (tumores de endométrio)	96	65,7 ±10,3
Controles (endométrio sadio)	128	47,5 ±10,2

Idade representada em média e desvio-padrão

O resumo da análise descritiva das variáveis histológicas dos tumores encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Análise descritiva das variáveis histológicas nos casos (n=96)

FATOR	N	Percentual (%)
Tipo histológico tumoral		
Adenocarcinoma endometrióide	86	90
Endometrióide / viloglandular	1	1
Viloglandular	1	1
Sarcoma de estroma	3	3
Células Claras	2	2
Misto (endometrióide/cél claras)	1	1
Mülleriano	1	1
Seroso	1	1
Grau tumoral		
1	8	8
2	67	70
3	13	14
não aplicável*	8	8
Linfonodos		
Positivos	9	9
Negativos	33	34
Não analisados	54	56
Estadiamento Cirúrgico		
I A	15	16
I B	41	43
II	13	14
III A	12	13
III B	0	0
III C1	9	9
III C2	0	0
IV A	4	4
IV B	2	2

* sarcoma de estroma, células claras, misto, mulleriano e seroso

O tipo histológico mais freqüente foi o adenocarcinoma endometrióide (86 casos – 90 %). Outros tipos encontrados foram: 1 caso de adenocarcinoma endometrióide com áreas viloglandulares, 1 caso de adenocarcinoma viloglandular, 3 casos de sarcoma de estroma endometrial, 2 casos de adenocarcinoma de células claras, 1 caso de tumor misto (endometrióide e células claras), 1 caso de tumor mülleriano e 1 caso de tumor seroso papilar.

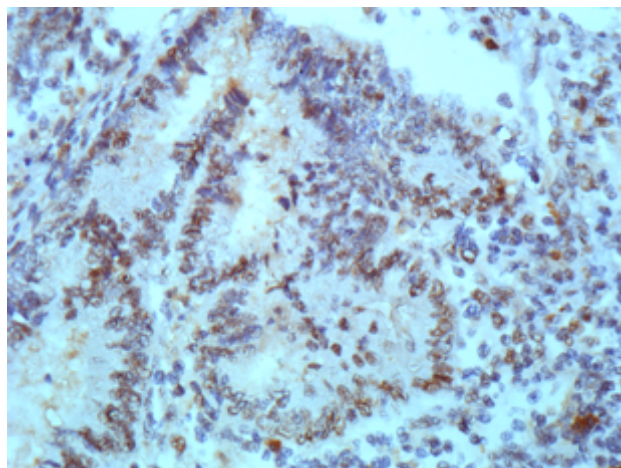
Quanto ao grau histológico, maior parte dos casos eram grau 2 (tumores moderadamente diferenciados), constituindo 71% da amostra. Os tumores do tipo histológico não-endometrióide não possuem classificação quanto ao grau e foram agrupados na categoria “não aplicável = N.A” (n= 8; vide tabela 2).

A média de tamanho dos tumores foi de 4,2 cm (desvio-padrão de 2,4 cm).

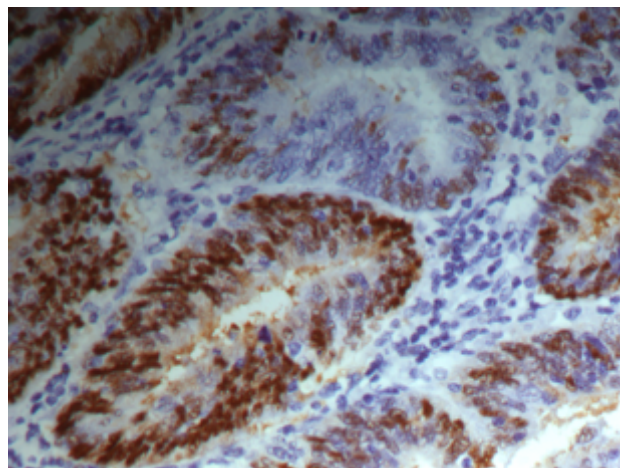
A margem cirúrgica foi livre na maioria dos casos (n = 94, 98%). A análise dos linfonodos foi realizada em apenas 42 pacientes (44%), destas 9 apresentaram linfonodos positivos e 33 linfonodos negativos.

Quanto ao estadiamento cirúrgico, a maioria dos tumores encontrava-se no estágio 1B (43%) – tumores limitados ao corpo uterino com invasão de menos da metade do miométrio.

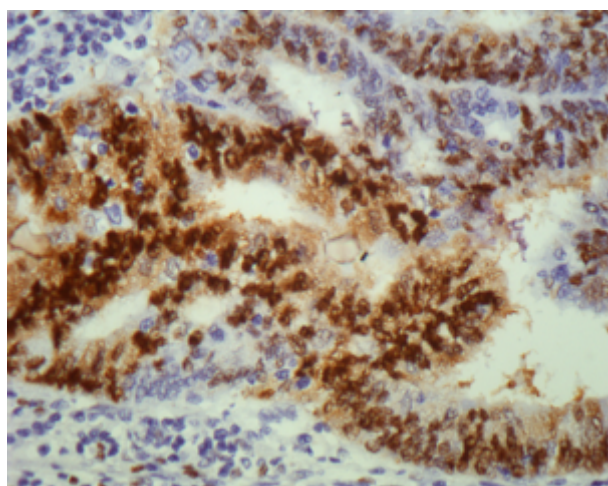
A expressão de SIRT1, RE, RP e p53 foi obtida através do percentual médio de positividade de células (glandulares e do estroma) em cada amostra. As figuras 1 e 2 ilustram a representação da expressão imunohistoquímica de SIRT1, RE, RP e p53 em casos e controles através da coloração nuclear marrom.



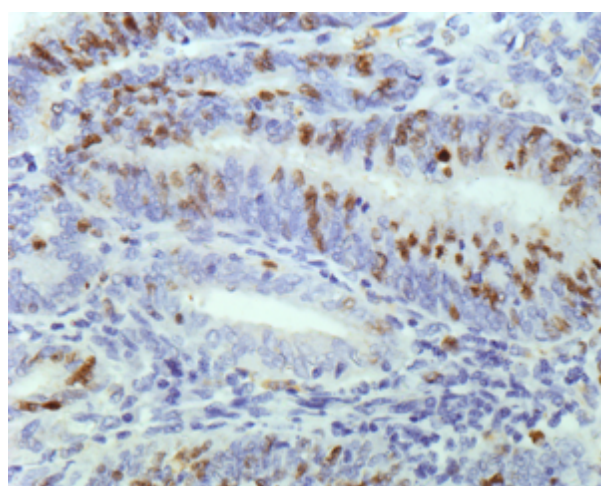
a) SIRT1



b) RE

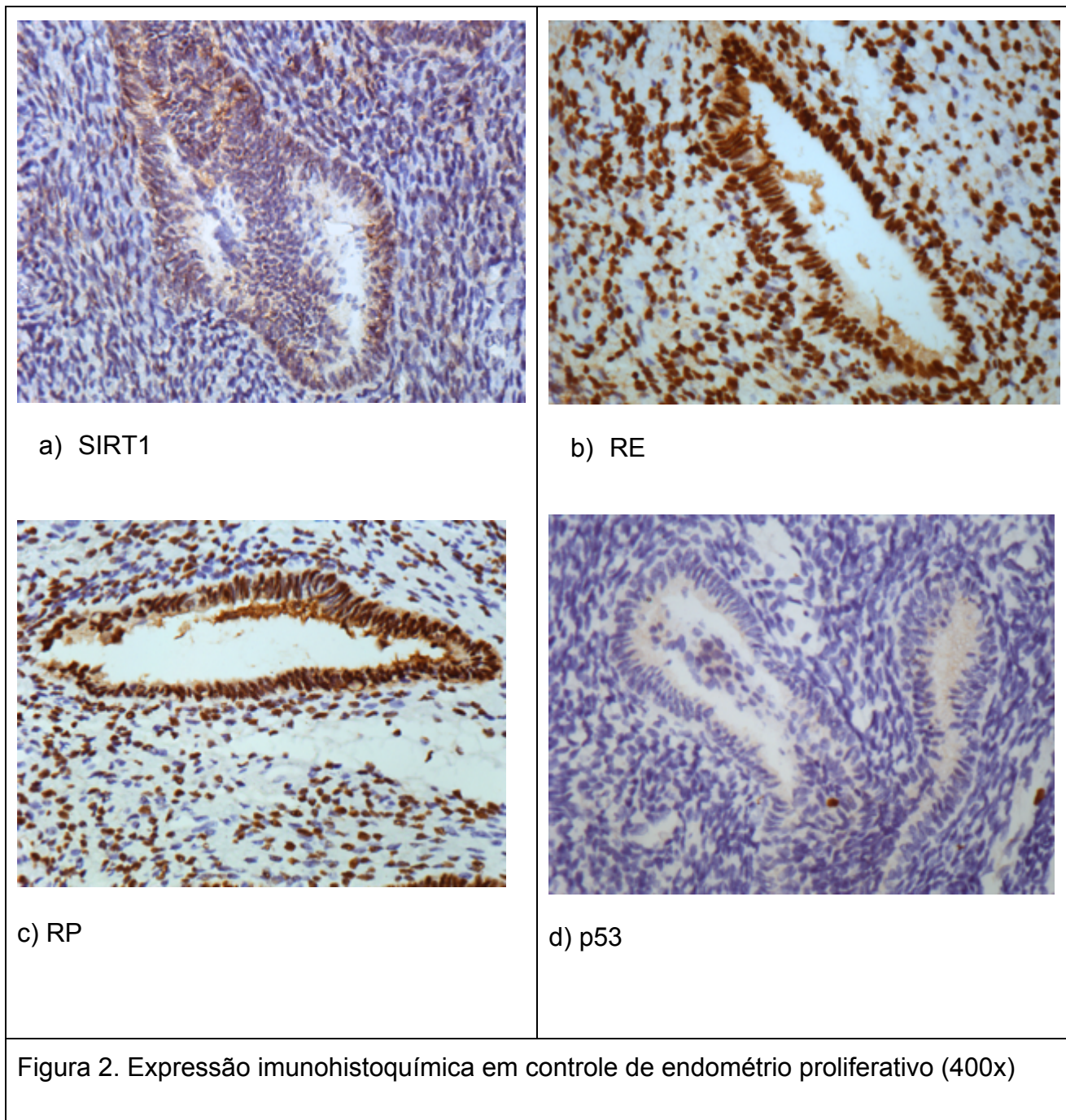


c) RP



d) p53

Figura 1. Expressão imunohistoquímica em caso de adenocarcinoma endometrióide (400x)



Os dados relativos à expressão de SIRT1, RE, RP e p53 entre casos e controles estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Análise do percentual de expressão dos diversos fatores estudados em relação aos casos (tumores) e controles (endométrio sadio), com ajuste para idade

	Casos (n=96)	Controles (n=128)	p	p'
SIRT1	24,8 (7,8 a 66,2)	12,0 (3,1 a 29,5)	0,001	0,002
RE	25,7 (13,8 a 34,7)	35,5 (23,5 a 48,1)	< 0,001	< 0,001
RP	27,2 (9,3 a 42,8)	37,9 (21,7 a 46,7)	0,001	0,005
P53	8,5 (1,9 a 16,4)	5,5 (3,6 a 9,1)	0,187	0,222

Os dados são representados em mediana e intervalo interquartis. p: significância obtida em Mann-Whitney ($p \leq 0,05$). p' : análise ajustada para idade obtida em Ancova em dados com transformação de postos (*Rank Transformed Data*).

Em virtude do número reduzido de tumores do tipo não-endometrióide, não foi feita análise de subgrupo entre os tipos tumorais.

Em relação as variáveis tumorais, estratificamos a amostra dos casos buscando analisar se houve diferença de expressão de acordo com o grau e o estadiamento cirúrgico, agrupando fatores de melhor prognóstico (grau 1 e 2; estadiamento I e II) *versus* fatores de pior prognóstico (grau 3 e N.A. ; estadiamento III e IV) – tabela 4.

Tabela 4: Análise do percentual de expressão dos diversos fatores estudados em relação ao grau e estadiamento cirúrgico

	Sirt1	p	RE	p	RP	p	p53	p	
GRAU	1 e 2	22,6	0,498	26,3	0,091	32,8	0,002	9,3	0,94
	(n=75)	(6,8; 71,7)		(16,5; 36,7)		(15,6;44,8)		(2,2; 16,4)	
GRAU	3/NA	29,9		11,5		8,7		8,3	
	(n=21)	(14,2; 57,8)		(3,0 ; 33,4)		(3,0;25,5)		(1,7; 17,9)	
ESTADIAMENTO	I-II	17,5	0,11	27,3	0,063	30,2	0,004	6,3	0,007
	(n=69)	(5,7; 67,3)		(15,6; 38,5)		(18,0;44,9)		(1,1;14,0)	
ESTADIAMENTO	III-IV	30,6		19,5		10,3		11,9	
	(n=27)	(21,0; 64,6)		(2,4 ; 32,6)		(3,0;38,9)		(5,2; 22,8)	

Os dados são representados em mediana e intervalo interquartis. P: significância obtida em Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Em razão dos diferentes tipos de endométrio sadio e a influência hormonal sobre os tecidos, buscamos também analisar a expressão imunohistoquímica dentro dos diferentes tipos de endométrio (tabela 5).

Tabela 5. Análise do percentual de expressão dos diversos fatores estudados em relação ao tipo de endométrio

	Endométrio Proliferativo (n=51)	Endométrio Secretor (n=50)	Endométrio Atrófico (n=27)	p
SIRT1	13,7 (8,5 a 23,3) ^a	9,7 (1,7 a 98,2) ^{a,b}	6,5 (2,1 a 13,7) ^b	0,008
RE	41,2 (29,6 a 52,4) ^a	29,5 (20,4 a 43,4) ^b	29,9 (18,9 a 44,0) ^b	0,007
RP	42,3 (30,4 a 49,4) ^a	37,2 (20,1 a 46,1) ^{a,b}	28,9 (15,0 a 41,5) ^b	0,008
P53	7,1 (3,8 a 12,8)	4,8 (2,9 a 5,8)	7,1 (5,0 a 11,5)	0,633

Os dados são representados em mediana e intervalo interquartis. p: significância obtida em Kruskal-Wallis. Letras índices não coincidentes representam diferenças significativas ao procedimento pos-hoc ($p \leq 0,05$). Holms' multiple comparison adjustment.

A expressão de SIRT1 foi maior nos casos em comparação aos controles, mesmo após análise ajustada para idade, ao passo que a expressão de RE e RP foi maior nos controles. A expressão de p53 não demonstrou diferença entre os grupos, sendo pouco expressa tanto nos tumores como no endométrio sadio (mediana abaixo de 10%), o que caracteriza a baixa expressão deste marcador em endométrio.

Na análise entre grupos de melhor prognóstico x pior prognóstico, não houve diferença significativa na expressão de SIRT 1, RE e p53 na comparação entre tumores grau 1 e 2 *versus* grau 3 e N.A, ao passo que houve queda significativa na expressão de RP nos tumores grau 3 e n/a (mediana de expressão de 32,8% grau 1 e 2 x 8,7% grau 3 e N.A.). Este achado também foi encontrado na análise dos casos quanto ao estadiamento, demonstrando uma queda significativa na expressão de RP nos tumores nos estádios III e IV (I e II: 30,2% x III e IV: 10,3%). Ainda, nos tumores estádios III e IV houve um aumento significativo na expressão de p53. RE e SIRT 1 não demonstraram

diferença na expressão entre os grupos de estadiamento. Assim, os tumores de pior prognóstico quanto ao grau e estadiamento demonstraram uma queda na expressão de RP. O aumento na expressão de p53 foi identificado nos estádios mais avançados.

Quanto aos tipos de endométrio, a expressão de SIRT 1 e RP foi maior no endométrio proliferativo, sendo diferente estatisticamente apenas do endométrio atrófico. RE também teve expressão maior no endométrio proliferativo, diferenciando-se do endométrio secretor e atrófico. A expressão de p53 não demonstrou diferença entre os grupos.

DISCUSSÃO

De forma semelhante aos dados da literatura, a maioria dos tumores em nosso estudo foi do tipo adenocarcinoma endometrióide (90% da amostra), em pacientes com média de idade de 65,7 anos, tumores grau 2 (70%) e com estadiamento inicial (I B - 40%).

Nossos resultados evidenciaram uma maior expressão de SIRT1 e menor expressão dos receptores hormonais (RE/RP) nas amostras de câncer de endométrio quando comparadas com controles. Estes achados demonstram que no endométrio neoplásico, há uma maior expressão de SIRT1 e uma menor expressão de receptores hormonais. A expressão de p53 não demonstrou diferença entre casos e controles, ambos apresentando uma baixa expressão deste fator. Provavelmente estes achados se devem ao tipo histológico dos nossos casos, constituídos basicamente por tumores endometrióides. Em virtude do número pequeno dos outros tipos tumorais, não foi possível realizar análise estratificada por tipo histológico.

Existe uma expressão imunohistoquímica diversa no que se refere à expressão de p53 e receptores hormonais nos diferentes tipos histológicos de câncer de endométrio. Os dois tipos histológicos mais estudados desta neoplasia são o endometrióide e o seroso, exibindo comportamento biológico distintos, sendo os tumores serosos mais agressivos. Uma forte imunorreatividade de p53 é vista em 80% dos tumores serosos, sendo

encontrada em apenas 20% dos tumores endometrióides.(20) A expressão de RE/RP é prevalente nos tumores endometrióides grau 1 e 2 e fraca ou ausente nos tumores serosos, células claras e endometrióide grau 3.(21) Quanto às alterações moleculares, aproximadamente 20% dos tumores endometrióides esporádicos exibem instabilidade de microsátélites e inativação do gene MHL1 (sistema de reparo de erro), o que ocorre através da hipermetilação das *CpGs islands*, um processo denominado de silenciamento genético. A inativação do gene supressor tumoral PTEN é visto em aproximadamente 80% dos tumores endometrióides e parece ser um evento precursor. Instabilidade cromossômica e mutação no gene p53 são encontradas nos tumores serosos.(22) (23)

Os carcinomas de endométrio bem diferenciados e em estágios precoces habitualmente expressam receptores hormonais de estrogênio e progesterona, ao passo que nos tumores mais agressivos há perda da expressão, e este fator tem sido associado a mau prognóstico. Com o intuito de determinar a expressão dos receptores de estrogênio alfa (RE α), receptor de progesterona A (RP A), receptor de progesterona B (RP B) e ki 67 foi realizado um estudo avaliando a expressão imunohistoquímica na porção superficial e profunda dos tumores (porção associada à invasão miometrial) em 15 casos de adenocarcinoma endometrióide e comparada com 5 biópsias de endométrio não neoplásico. A expressão de RE α foi menor nos tumores (maior redução na porção profunda *versus* superficial), tanto nas glândulas endometriais como no estroma. Ainda, a expressão de RE α foi menor nas células do estroma em comparação com as células glandulares, indicando que as células do estroma são mais afetadas e que a avaliação de sua expressão é tão importante quanto a das células glandulares. Quanto à expressão de RP, as duas isoformas também demonstraram redução ou ausência de expressão nos tumores, mais evidente nos tumores de maior grau e com maior invasão miometrial. Alguns estudos anteriores demonstraram correlação entre a diminuição da expressão de RP e aumento de *E-caderina*, invasão miometrial e pior prognóstico. A expressão de Ki 67 foi maior nos tumores como esperado, apesar de existir variedade de expressão nos tecidos normais.(24)

Nosso estudo realizou análise imunohistoquímica das amostras considerando as células glandulares e do estroma e evidenciou uma redução

importante na expressão dos receptores de progesterona (RP) comparando grau 1 e 2 *versus* grau 3 / N.A. (mediana de expressão de 32,8% x 8,7%, $p=0,002$) e na comparação entre estágio I-II *versus* III-IV (mediana de expressão de 30,2% x 10,3%, $p=0,004$), verificando uma baixa expressão de RP associada aos tumores de pior prognóstico.

Alguns trabalhos têm demonstrado que a diminuição na expressão dos receptores de progesterona (RP) nos tumores de endométrio tem sido realmente associada a um marcador de pior prognóstico. A fim de verificar a expressão dos RP no câncer de endométrio, foi realizado um estudo com 686 tumores primários e 171 lesões metastáticas utilizando imunohistoquímica e análise de RNA dos espécimes cirúrgicos. Imunohistoquímica de RP foi predominantemente nuclear e observada tanto no tecido glandular, como no estroma; sendo a análise realizada apenas nas células glandulares. A perda da expressão de RP foi associada a marcadores tumorais de pior prognóstico em todos os pacientes e no subgrupo de tumores endometrióides. Na análise ajustada para idade, estadiamento FIGO e grau histológico, a expressão de RP demonstrou ser um fator independente. Ainda, a expressão imunohistoquímica *versus* expressão RNAm teve alta correlação. As lesões metastáticas tiveram o maior declínio na expressão de RP (redução de 23% nos tumores primários x 76% nas lesões metastáticas). (25)

Diversos marcadores têm sido estudados em busca de uma maior compreensão quanto à diversidade tumoral e a implicação destes marcadores no tratamento e no prognóstico das neoplasias de endométrio. Foi realizado um estudo com 364 casos de carcinoma de endométrio submetidos à análise imunohistoquímica de vários fatores como: receptor de estrogênio, receptor de progesterona, fator de crescimento epidermal, her-2, p16, p53 entre outros. Heterogeneidade global foi identificada em 39 casos (11%). Os fatores relacionados a uma menor sobrevida foram: baixa expressão de RE, RP e fator ERBB3; bem como alta expressão de ERBB2, TOP2A e p53. Estes dados corroboram com a associação entre baixa expressão hormonal dos receptores e pior prognóstico. (26)

O papel da obesidade, hiperinsulinemia e diabetes na biologia do câncer de endométrio podem estar associados ao fator de crescimento semelhante à

insulina (IGF1 – insulin-like growth factor1). Com o objetivo de verificar se IGF1 pode ser um marcador utilizado em câncer de endométrio, foi realizado um estudo com 35 pacientes com tumores serosos de endométrio e 17 tumores metastáticos, demonstrando alta expressão imunohistoquímica de receptores de IGF-1 (IGF1R) em 42,8% dos tumores primários e 77,8% dos tumores metastáticos. Ainda, houve alta expressão de p53 em 68,6% dos tumores primários e 100% nos tumores metastáticos. A sobrevida foi significativamente menor nos tumores que superexpressaram p53 comparando com baixa expressão. Não houve correlação entre sobrevida e expressão de IGF1R. p53 parece regular a expressão de IGF1R nos tumores de endométrio a partir de um mecanismo que envolve a repressão da promoção de IGF1. A desregulação patológica da expressão de IGF1R por mutação de p53, aumentaria a sua expressão nos tumores.(27) Nosso estudo demonstrou um aumento da expressão de p53 nos tumores estádios III e IV.

Receptores esteróides (receptores de estrogênio, progesterona e androgênios) podem ser diretamente modificados por quinases, histonas acetiltransferases e modificadores *ubiquitin-like*, que atuam alterando a ligação de DNA, a atividade de transcrição e a sensibilidade aos hormônios. Os hormônios esteróides atuam como fatores que comandam a transcrição de genes alvo. A regulação dos genes de transcrição por parte dos hormônios necessita de outras proteínas chamadas de co-reguladores, que se ligam para modular a expressão gênica. Co-ativadores são fatores que recrutam proteínas que atuam na ligação entre hormônios e gene alvo ou que atuam na modificação das histonas. Co-repressores são fatores que impedem a ligação hormônio-alvo ou que recrutam histonas desacetilases com o intuito de suprimir a expressão gênica. DNA metiltransferases, proteínas de metil CpG, histonas acetiltransferases (HATs), histonas desacetilases (HDACs), histonas metiltransferases (HMTs) e histonas metildesacetilases (HDMs) estão presentes no endométrio, mas a compreensão de todos estes fatores, bem como a aplicabilidade clínica disto, ainda está para ser definida. Neste contexto, SIRT1 está presente no endométrio, mas a sua interação com os receptores hormonais ainda não está estabelecida. (28)

Na análise dos controles (endométrieo proliferativo x secretor x atrófico), houve menor expressão de SIRT1 e RE no endométrieo atrófico em comparação com o endométrieo proliferativo, verificando uma possível associação entre a expressão de SIRT1 e receptores hormonais mesmo no endométrieo sadio. A expressão de RP foi maior no endométrieo proliferativo, sendo diferente estatisticamente apenas do endométrieo atrófico. A expressão de p53 não demonstrou diferença entre os grupos, apresentando baixa expressão em todos os grupos.

A interação entre receptores hormonais e SIRT1 tem sido estudada em tumores de próstata e mama. Anormalidades no receptor de androgênios (AR) têm sido relacionadas à patogênese e progressão do Câncer de Próstata. A partir dos trabalhos relacionando SIRT1 com p53 e sobrevivência celular ao estresse, desenvolveu-se um estudo a fim de verificar o papel de SIRT1 na função do receptor androgênico em câncer de próstata. Neste estudo, identificou-se que células tumorais de próstata tratadas com SIRTINOL (inibidor de SIRT1) tiveram um aumento na acetilação de receptores androgênios, sugerindo um papel de SIRT1 na regulação da acetilação de AR. Além disso, a expressão de SIRT1 reduz os níveis basais de receptores androgênios em 10% e praticamente anula os níveis de dehidrotestosterona (DHT) induzidos pelo excesso de AR. Ainda, o crescimento celular das células tumorais de próstata foi inibido pela expressão de SIRT1, o que sugere que SIRT1 inibe a carcinogênese nestes tumores, bloqueando proliferação celular. Assim, pode-se sugerir que SIRT1 reprime a sinalização e a função dos receptores de androgênios. O aumento da atividade destes receptores, a partir da perda de fatores repressores, têm sido relacionado ao crescimento células tumorais de próstata. SIRT1 parece exercer um papel inibitório nestes receptores e promover a regulação da proliferação das células tumorais nestes tumores.(15)

Outro estudo envolvendo três linhagens celulares tumorais de próstata (LNCap, PC3 e DU 145), verificou um aumento na expressão de SIRT1 em todas as linhagens em comparação com as células normais de próstata. Este aumento foi de 2,2 e 2,5 vezes maior na linhagem PC3 e DU145 (não expressam AR) em comparação à linhagem LNCap (expressa AR), identificado através de *real-time PCR*, identificando maior expressão de SIRT1 nas

linhagens que não expressam AR. O uso de SIRTINOL (inibidor de SIRT1) promoveu quimiossensibilização de Cisplatina e Campotecina, resultando em inibição do crescimento celular nas linhagens PC3 e DU145 (linhagens com maior expressão de SIRT1). A diferença de expressão de SIRT1 nas linhagens também pode ser devida à falta de expressão de p53 na linhagem PC3, causando um aumento na expressão de SIRT1. O papel de SIRT1 no crescimento celular parece ser diferente nas linhagens celulares de tumores de próstata dependendo dos receptores de androgênio. Nas linhagens sensíveis aos androgênios (LNCap), há inibição do crescimento celular na presença de deidrotestosterona e superexpressão de SIRT1, ao passo que nas linhagens que não expressam androgênios (PC3 e DU145), SIRT1 está associada a maior resistência aos quimioterápicos e à proliferação celular. (29)

Sabe-se que o estrogênio é um componente importante no desenvolvimento da glândula mamária e da carcinogênese dos tumores de mama. A relação entre SIRT1 e receptores de estrogênios alfa ($ER\alpha$) foi estudada em linhagens de células de tumores de mama. Verificou-se que nas linhagens tumorais com receptores hormonais positivos para $ER\alpha$ (linhagem MCF-7) tratadas com Nicotinamida (inibidor de histonas desacetilases classe III –IHDAC III) ou Sirtinol (inibidor específico de SIRT1) houve diminuição dos níveis de RNAm de $ER\alpha$ confirmado por *real time PCR*, demonstrando um efeito positivo de SIRT1 na expressão dos receptores de estrogênio $ER\alpha$. (30)

Outro estudo utilizando linhagens celulares de tumores de mama MCF-7, verificou a associação entre CCAR1 (*Cell Cycle and Apoptosis Regulator 1*), DBC1 e SIRT1 na expressão de receptores hormonais. CCAR1 se liga ao receptor de estrogênio $RE\alpha$ e induz a proliferação das células tumorais de câncer de mama estrogênio-dependentes. Apesar de DBC1 ter sido levantado como gene supressor tumoral ao inibir SIRT1 e assim promover a apoptose via p53, alguns estudos tem demonstrado um aumento na expressão de DBC1 em tumores de mama. DBC1 possui um efeito sinérgico ao CCAR1, promovendo um aumento da função do $RE\alpha$ (efeito promotor). SIRT1 atua nesta rota inibindo a ligação entre CCAR1 e DBC1 – compete com CCAR1, promovendo redução de $RE\alpha$ (efeito inibitório sobre $ER\alpha$). Ainda, DBC1 inibe a interação entre SIRT1 e receptor $RE\alpha$. Concluindo, DBC1 ativa CCAR1 (que ativa $RE\alpha$)

e inibe SIRT1 (que inativa RE α). Neste estudo, SIRT1 teria um papel inibitório na expressão dos receptores estrogênio.(31)

A interação entre receptores hormonais e SIRT1 também foi verificada em outro estudo com linhagens MCF-7 de tumores de mama. Sabe-se que o estrogênio é um importante fator carcinogênico nas neoplasias de mama e que seu metabólitos oxidativos são responsáveis pelo dano ao DNA e mutações. Receptor de estrogênio alfa (RE α) promove o transporte de metabólitos tóxicos do estrogênio para o núcleo da célula aumentando o dano oxidativo ao DNA. Algumas enzimas removem esses metabólitos genotóxicos, como NQO1 e GSTs (glutathione S transferases). O fator de transcrição NFR2 se liga a fatores de resposta a elementos antioxidantes (ARE) e promove a transcrição NQO1 e GSTs. Moduladores dos receptores de estrogênios (SERMs), como tamoxifeno, atuam preferencialmente em receptores de estrogênio beta (RE β), ativando a transcrição de NQO1. Uso de estrogênio nas células tumorais de mama linhagem MCF-7 inibiu a atividade de NQO1. RE α e SIRT1 atuam promovendo a inativação da transcrição de NQO1 (efeito repressor). O uso de Shikonina (antiestrogênio) inibiu a expressão de RE α , revertendo o efeito inibitório sobre NQO1. (32)

A partir destes estudos, pode-se verificar que o papel de SIRT1 nos receptores hormonais em próstata e mama ainda é controverso, evidenciando efeitos protetores e promotores da carcinogênese. Em nosso estudo, houve maior expressão de SIRT1 nos tumores em comparação com controles, ao passo que houve redução na expressão dos receptores hormonais. P53 não teve diferença na expressão entre casos e controles, apenas foi evidenciado um aumento expressão na análise de subgrupo de pior prognóstico quanto ao estadiamento tumoral. O painel imunohistoquímico dos nossos tumores evidenciou maior expressão de SIRT1 e menor expressão de receptores hormonais (RE, RP), sugerindo um papel de SIRT1 como promotor da carcinogênese, uma vez que a perda da expressão de receptores hormonais no endométrio está associada a pior prognóstico.

Apesar de existirem vários estudos buscando identificar qual o melhor painel de marcadores, os fatores mais investigados e validados na avaliação do câncer de endométrio são RE, RP, p53 e alterações de DNA. A perda de

receptores hormonais nos tumores endometrióides está relacionada à agressividade tumoral, bem como a superexpressão de p53 a uma piora na sobrevida. Atualmente, a análise destes marcadores não é incorporada na prática clínica, sendo as decisões terapêuticas (tratamento hormonal) iniciadas sem o conhecimento prévio do *status* dos receptores hormonais. A doença metastática é discordante da lesão primária em 18-45% dos casos, sendo a positividade para receptores hormonais um fator de melhora de resposta e sobrevida. (33)

O tratamento hormonal no câncer de endométrio é constituído de dois tipos: derivados da progesterona e regimes antiestrogênio. Há correlação positiva entre resposta ao tratamento com progestágenos (acetato de medroxiprogesterona) e *status* dos receptores hormonais, sendo a resposta maior nos tumores que expressam RE e RP. Outras alternativas como o uso de SERMs (Selective Estrogen Receptor Moduladores) – tamoxifeno, raloxifeno e arzoxifeno – também estão sendo estudadas, mas ainda com resultados não muito encorajadores. Os análogos do GnRH (goserelina) e os inibidores da aromatase (anastrozole, letrozole) também demonstraram pouca resposta na doença avançada. A pesquisa de receptores hormonais, principalmente nos tumores endometrióides (onde há maior perda da expressão na recidiva tumoral) pode ser uma alternativa para guiar o tratamento deste grupo de pacientes, bem como combinar regimes de tratamento que promovam a reexpressão dos receptores hormonais com o intuito de melhorar a resposta. A medicina do futuro vai individualizar a terapêutica baseada na análise genética do tumor e no padrão de expressão de cada paciente, sendo a análise de receptores hormonais um passo inicial para tentar individualizar o tratamento.(34)

Alguns estudos envolvendo inibidores de histonas desacetilases estão sendo testados em linhagens de câncer de endométrio. Acredita-se que o mecanismo de ação destas drogas esteja na hiperacetilação de histonas, desmetilação do DNA genômico e ativação de genes que inibem a proliferação celular.(35)

Sobre a ação de inibidores de histonas desacetilases em câncer de endométrio, foi realizado um estudo comparando o inibidor *TRICOSTATIN A*

(TSA) com outros agentes citotóxicos utilizados no tratamento desta patologia como Paclitaxel, Doxorrubicina e Carboplatina.(36) Utilizando-se linhagens tumorais de câncer de endométrio do subtipo seroso (linhagem Ark2) e endometrióide (linhagens KLE e AN3) evidenciou-se que a combinação de TSA e Paclitaxel inibe sinergicamente a proliferação celular nas células de tumores serosos de endométrio. Todos os agentes tiveram efeitos inibitórios na linhagem Ark2, mas a combinação TSA/Paclitaxel mostrou o resultado mais efetivo, reduzindo as contagens celulares em mais de 90% (individualmente TSA reduziu em 55% e Paclitaxel em 70%). Resultados semelhantes (aumento na proporção de células apoptóticas) foram encontrados nas linhagens endometrióides (KLE e NA3), mas não houve sinergismo significativo na associação TSA/Paclitaxel. Com o intuito de testar *in vivo* os resultados da combinação TSA/Paclitaxel, foi realizado um modelo tumoral (xenoenxerto) em camundongos a partir da injeção da linhagem celular Ark2, demonstrando-se, também uma ação sinérgica na inibição do crescimento tumoral (redução de mais de 50% do tamanho tumoral). A efetividade desta associação parece estar relacionada a acetilação da tubulina e reorganização dos microtúbulos. Deste modo, sugere-se que inibidores de desacetilases são uma classe promissora de agentes e que podem ser úteis na associação com agentes tradicionais.(36) Este estudo obteve uma resposta mais promissora com o uso de inibidores de histonas desacetilases em tumores serosos de endométrio e não em tumores endometrióides, sugerindo que a ação destas drogas possa estar mais relacionada a um determinado tipo histológico, provavelmente devido às alterações moleculares peculiares de cada variante. Uma consideração a ser feita é que TSA é um inibidor de histonas desacetilases das classes I e II e não específico de sirtuínas.

A fim de verificar o quanto os IHDAC afetam a migração e invasão das células endometriais cancerosas foi realizado um estudo utilizando linhagens celulares humanas de adenocarcinoma de endométrio positivos para receptores de estrogênio e progesterona (Ishikawa - clone 3-H-12) e carcinoma adenoescamoso (RL95-2). Tratamento com hormônios esteróides, TSA e SAHA aumentaram a migração celular com um aumento na regulação de glicodelina (glicoproteína que exerce papel na regulação da motilidade celular).

A superexpressão resultou em um aumento da motilidade das células Ishikawa. Nas células RL95-2 houve um aumento da migração celular com tratamento hormonal e SAHA, porém com baixos níveis de glicodelina. A expressão de glicodelina nos tumores está associada a bom prognóstico; pacientes com carcinoma seroso de ovário tratados com quimioterapia e que expressam glicodelina possuem uma sobrevida maior quando comparados com pacientes sem expressão que possuem o mesmo grau e estadiamento da doença.(37) Isto se deve em parte às características de indução da citodiferenciação, propriedades antiproliferativas e apoptose.(38) Este estudo demonstrou uma maior eficácia da associação com inibidores de histonas desacetilases nas linhagens celulares com receptores hormonais positivos.

Outro estudo envolvendo linhagens tumorais de endométrio foi realizado com Oxamflatin (IHDAC) e inibidor HDAC -1 em células ARK2 (tumor seroso), Ishikawa (tumor endometrióide bem diferenciado) e AN3 (tumor endometrióide pouco diferenciado).(39) Verificou-se inibição do crescimento nas 3 linhagens com o uso das drogas, sendo este efeito mais marcante nas células ARk2, tendo um efeito supressor maior com *Oxamflatin* do que com o inibidor HDAC-1. Nas linhagens AN3 o efeito foi maior com o inibidor HDCA-1. Do mesmo modo, a indução de apoptose com as duas drogas foi maior na linhagem Ark2, evidenciando um aumento de 8x na proporção de células apoptóticas. Nas outras linhagens o aumento foi de 3 a 4x. Este estudo demonstra eficácia na supressão do crescimento celular nos dois tipos principais de câncer de endométrio, porém mais marcante nos tumores serosos.

Recentemente outro estudo envolvendo um inibidor natural de histonas desacetilases denominado PSA (*Psammaplin A*) foi testado em linhagens Ishikawa.(40) Houve inibição da proliferação celular de modo dose-dependente, aumento de histonas acetiladas H3 e H4 e diminuição da proteína HDAC-1 (histona desacetilase). Há um aumento na expressão da ciclina inibitória p21 e diminuição de p53 (mutado nas células Ishikawa), o que indica que PSA causa ativação de p21 levando a apoptose de uma maneira p53 - independente. Ainda, PSA inibe o ciclo celular através de parada da célula em G2/M e indução da apoptose. (40)

Apidicin possui atividade inibitória de histonas desacetilases, promovendo a acetilação de histonas e um efeito antitumoral em linhagens celulares de câncer de endométrio, promovendo genes relacionados com a parada no ciclo celular e apoptose. Foi realizado um estudo com linhagens celulares Ishkawa e uso de *Apidicin*, demonstrando significativa inibição do crescimento celular (53%), reduzindo a expressão de HDAC3 e HDAC4. Ainda, *Apidicin* aumentou a expressão de p21. Estes achados sugerem a que *Apidicin* é um potencial agente antitumoral contra câncer de endométrio. (41)

Assim, há um potencial terapêutico inicial evidente em estudos pré-clínicos com drogas inibidoras de histonas desacetilases no câncer de endométrio, mas qual o papel específico de SIRT1 nestas etapas não está bem estabelecido. Ainda, as drogas mais utilizadas são inibidoras das classes I e II de histonas desacetilases (TSA, SAHA) e não drogas inibidoras específicas de sirtuínas. Deste modo, a avaliação dos receptores hormonais (painel imunohistoquímico) pode ser uma importante ferramenta que deve ser incorporada na prática clínica para auxiliar nas decisões terapêuticas em pacientes com recidiva tumoral.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A fim de promover uma melhor elucidação sobre a expressão de SIRT1 nos tumores de endométrio e definir adequadamente qual o seu papel nesta doença, torna-se necessário realizar outros estudos utilizando técnicas de biologia molecular, incorporando ou não esta proteína no perfil de alterações moleculares dos tumores de endométrio e propondo, talvez, um possível alvo terapêutico para esta patologia. Estudos com drogas inibidoras seletivas de SIRT1 em linhagens celulares de câncer de endométrio também podem ajudar a esclarecer esta possibilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (DO ARTIGO)

1. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science (New York, NY)*. 2001;293(5532):1074-80.
2. Taddei A, Roche D, Bickmore WA, Almouzni G. The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anticancer therapy? *EMBO reports*. 2005;6(6):520-4.
3. Cress WD, Seto E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *Journal of cellular physiology*. 2000;184(1):1-16.
4. Archer SY, Hodin RA. Histone acetylation and cancer. *Current opinion in genetics & development*. 1999;9(2):171-4.
5. Mai A, Massa S, Lavu S, Pezzi R, Simeoni S, Ragno R, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of sirtinol analogues as class III histone/protein deacetylase (Sirtuin) inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*. 2005;48(24):7789-95.
6. Grozinger CM, Schreiber SL. Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chemistry & biology*. 2002;9(1):3-16.
7. Lamming DW, Wood JG, Sinclair DA. Small molecules that regulate lifespan: evidence for xenohormesis. *Molecular microbiology*. 2004;53(4):1003-9.
8. Blander G, Guarente L. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annual review of biochemistry*. 2004;73:417-35.
9. Tanner KG, Landry J, Sternglanz R, Denu JM. Silent information regulator 2 family of NAD- dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(26):14178-82.
10. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*. 2001;107(2):137-48.
11. Voelter-Mahlknecht S, Mahlkecht U. Cloning, chromosomal characterization and mapping of the NAD-dependent histone deacetylases gene sirtuin 1. *International journal of molecular medicine*. 2006;17(1):59-67.
12. Bordone L, Guarente L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nature reviews*. 2005;6(4):298-305.

13. Yang T, Fu M, Pestell R, Sauve AA. SIRT1 and endocrine signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2006;17(5):186-91.
14. Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell*. 2005;123(3):437-48.
15. Fu M, Liu M, Sauve AA, Jiao X, Zhang X, Wu X, et al. Hormonal control of androgen receptor function through SIRT1. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(21):8122-35.
16. Lim CS. SIRT1: tumor promoter or tumor suppressor? *Medical hypotheses*. 2006;67(2):341-4.
17. Humber CE, Tierney JF, Symonds RP, Collingwood M, Kirwan J, Williams C, et al. Chemotherapy for advanced, recurrent or metastatic endometrial cancer: a systematic review of Cochrane collaboration. *Ann Oncol*. 2007;18(3):409-20.
18. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429(6990):457-63.
19. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2009;105(2):103-4.
20. Lax SF, Kendall B, Tashiro H, Slebos RJ, Hedrick L. The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer*. 2000;88(4):814-24.
21. Robert A. Soslow CI, Charles Zaloudek. Immunohistology of the female genital tract. In: Dabbs DJ, editor. *Diagnostic Immunohistochemistry 2002*. p. 655-7.
22. Darvishian F, Hummer AJ, Thaler HT, Bhargava R, Linkov I, Asher M, et al. Serous endometrial cancers that mimic endometrioid adenocarcinomas: a clinicopathologic and immunohistochemical study of a group of problematic cases. *The American journal of surgical pathology*. 2004;28(12):1568-78.
23. Bakkum-Gamez JN, Gonzalez-Bosquet J, Laack NN, Mariani A, Dowdy SC. Current issues in the management of endometrial cancer. *Mayo Clinic proceedings*. 2008;83(1):97-112.

24. Kreizman-Shefer H, Pricop J, Goldman S, Elmalah I, Shalev E. Distribution of estrogen and progesterone receptors isoforms in endometrial cancer. *Diagnostic pathology*. 2014;9:77.
25. Tangen IL, Werner HM, Berg A, Halle MK, Kusonmano K, Trovik J, et al. Loss of progesterone receptor links to high proliferation and increases from primary to metastatic endometrial cancer lesions. *European journal of cancer*. 2014;50(17):3003-10.
26. Supernat A, Lapinska-Szumczyk S, Majewska H, Gulczynski J, Biernat W, Wydra D, et al. Tumor heterogeneity at protein level as an independent prognostic factor in endometrial cancer. *Translational oncology*. 2014;7(5):613-9.
27. Bruchim I, Sarfstein R, Werner H. The IGF Hormonal Network in Endometrial Cancer: Functions, Regulation, and Targeting Approaches. *Frontiers in endocrinology*. 2014;5:76.
28. Guo SW. The endometrial epigenome and its response to steroid hormones. *Molecular and cellular endocrinology*. 2012;358(2):185-96.
29. Kojima K, Ohhashi R, Fujita Y, Hamada N, Akao Y, Nozawa Y, et al. A role for SIRT1 in cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 and DU145 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;373(3):423-8.
30. Yao Y, Li H, Gu Y, Davidson NE, Zhou Q. Inhibition of SIRT1 deacetylase suppresses estrogen receptor signaling. *Carcinogenesis*. 2010;31(3):382-7.
31. Yu EJ, Kim SH, Heo K, Ou CY, Stallcup MR, Kim JH. Reciprocal roles of DBC1 and SIRT1 in regulating estrogen receptor alpha activity and co-activator synergy. *Nucleic acids research*. 2011;39(16):6932-43.
32. Yao Y, Brodie AM, Davidson NE, Kensler TW, Zhou Q. Inhibition of estrogen signaling activates the NRF2 pathway in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2010;124(2):585-91.
33. Werner HM, Salvesen HB. Current status of molecular biomarkers in endometrial cancer. *Current oncology reports*. 2014;16(9):403.
34. Carlson MJ, Thiel KW, Leslie KK. Past, present, and future of hormonal therapy in recurrent endometrial cancer. *International journal of women's health*. 2014;6:429-35.

35. Wang J, Sauntharajah Y, Redner RL, Liu JM. Inhibitors of histone deacetylase relieve ETO-mediated repression and induce differentiation of AML1-ETO leukemia cells. *Cancer research*. 1999;59(12):2766-9.
36. Dowdy SC, Jiang S, Zhou XC, Hou X, Jin F, Podratz KC, et al. Histone deacetylase inhibitors and paclitaxel cause synergistic effects on apoptosis and microtubule stabilization in papillary serous endometrial cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*. 2006;5(11):2767-76.
37. Mandelin E, Lassus H, Seppala M, Leminen A, Gustafsson JA, Cheng G, et al. Glycodelin in ovarian serous carcinoma: association with differentiation and survival. *Cancer research*. 2003;63(19):6258-64.
38. Uchida H, Maruyama T, Ono M, Ohta K, Kajitani T, Masuda H, et al. Histone deacetylase inhibitors stimulate cell migration in human endometrial adenocarcinoma cells through up-regulation of glycodelin. *Endocrinology*. 2007;148(2):896-902.
39. Jiang S, Dowdy SC, Meng XW, Wang Z, Jones MB, Podratz KC, et al. Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis in both Type I and Type II endometrial cancer cells. *Gynecologic oncology*. 2007;105(2):493-500.
40. Ahn MY, Jung JH, Na YJ, Kim HS. A natural histone deacetylase inhibitor, Psammaplin A, induces cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial cancer cells. *Gynecologic oncology*. 2008;108(1):27-33.
41. Ahn MY, Chung HY, Choi WS, Lee BM, Yoon S, Kim HS. Anti-tumor effect of apicidin on Ishikawa human endometrial cancer cells both in vitro and in vivo by blocking histone deacetylase 3 and 4. *International journal of oncology*. 2010;36(1):125-31.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science (New York, NY)*. 2001;293(5532):1074-80.
2. Taddei A, Roche D, Bickmore WA, Almouzni G. The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anticancer therapy? *EMBO reports*. 2005;6(6):520-4.
3. Cress WD, Seto E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *Journal of cellular physiology*. 2000;184(1):1-16.
4. Archer SY, Hodin RA. Histone acetylation and cancer. *Current opinion in genetics & development*. 1999;9(2):171-4.
5. Mai A, Massa S, Lavu S, Pezzi R, Simeoni S, Ragno R, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of sirtinol analogues as class III histone/protein deacetylase (Sirtuin) inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*. 2005;48(24):7789-95.
6. Grozinger CM, Schreiber SL. Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chemistry & biology*. 2002;9(1):3-16.
7. Lamming DW, Wood JG, Sinclair DA. Small molecules that regulate lifespan: evidence for xenohormesis. *Molecular microbiology*. 2004;53(4):1003-9.
8. Blander G, Guarente L. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annual review of biochemistry*. 2004;73:417-35.
9. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*. 2001;107(2):137-48.
10. Voelter-Mahlknecht S, Mahlkecht U. Cloning, chromosomal characterization and mapping of the NAD-dependent histone deacetylases gene sirtuin 1. *International journal of molecular medicine*. 2006;17(1):59-67.
11. Humber CE, Tierney JF, Symonds RP, Collingwood M, Kirwan J, Williams C, et al. Chemotherapy for advanced, recurrent or metastatic endometrial cancer: a systematic review of Cochrane collaboration. *Ann Oncol*. 2007;18(3):409-20.

12. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429(6990):457-63.
13. Estrutura e Função dos Cromossomos e Genes. In: Thompson, McInnes, Willard, editors. *Genética Médica* 1993. p. 22-37.
14. Harvey AC, Downs JA. What functions do linker histones provide? *Molecular microbiology*. 2004;53(3):771-5.
15. Paulo Leser LECA. Anticorpos Antinucleossomo: Diagnóstico e monitoração do Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) 2004 [cited 2008 23 fev]. Available from: [http://www.fleury.com.br/Medicos/SaudeEmDia/Artigos/Pages/AnticorposAntinucleossomoDiagn%C3%B3sticoemonitora%C3%A7%C3%A3odoL%C3%BApusEritematosoSist%C3%AAmico\(LES\).aspx](http://www.fleury.com.br/Medicos/SaudeEmDia/Artigos/Pages/AnticorposAntinucleossomoDiagn%C3%B3sticoemonitora%C3%A7%C3%A3odoL%C3%BApusEritematosoSist%C3%AAmico(LES).aspx).
16. Zhao J. Coordination of DNA synthesis and histone gene expression during normal cell cycle progression and after DNA damage. *Cell cycle* (Georgetown, Tex. 2004;3(6):695-7.
17. Su C, Gao G, Schneider S, Helt C, Weiss C, O'Reilly MA, et al. DNA damage induces downregulation of histone gene expression through the G1 checkpoint pathway. *The EMBO journal*. 2004;23(5):1133-43.
18. Tanner KG, Landry J, Sternglanz R, Denu JM. Silent information regulator 2 family of NAD- dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(26):14178-82.
19. Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *The Journal of pathology*. 1999;187(1):112-26.
20. Gu W, Roeder RG. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*. 1997;90(4):595-606.
21. Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, et al. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*. 2001;107(2):149-59.
22. Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell*. 2005;123(3):437-48.
23. Solomon JM, Pasupuleti R, Xu L, McDonagh T, Curtis R, DiStefano PS, et al. Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not

alter cell survival following DNA damage. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(1):28-38.

24. Wang C, Wang MW, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Roles of SIRT1 and phosphoinositide 3-OH kinase/protein kinase C pathways in evodiamine-induced human melanoma A375-S2 cell death. *Journal of pharmacological sciences*. 2005;97(4):494-500.

25. Gan L, Han Y, Bastianetto S, Dumont Y, Unterman TG, Quirion R. FoxO-dependent and -independent mechanisms mediate SirT1 effects on IGF1 gene expression. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;337(4):1092-6.

26. Yang T, Fu M, Pestell R, Sauve AA. SIRT1 and endocrine signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2006;17(5):186-91.

27. Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, et al. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science (New York, NY)*. 2004;305(5682):390-2.

28. Bordone L, Guarente L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nature reviews*. 2005;6(4):298-305.

29. Edwards J, Bartlett JM. The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 2: Androgen-receptor cofactors and bypass pathways. *BJU international*. 2005;95(9):1327-35.

30. Fu M, Liu M, Sauve AA, Jiao X, Zhang X, Wu X, et al. Hormonal control of androgen receptor function through SIRT1. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(21):8122-35.

31. Kojima K, Ohhashi R, Fujita Y, Hamada N, Akao Y, Nozawa Y, et al. A role for SIRT1 in cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 and DU145 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;373(3):423-8.

32. Huffman DM, Grizzle WE, Bamman MM, Kim JS, Eltoum IA, Elgavish A, et al. SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. *Cancer research*. 2007;67(14):6612-8.

33. Nakane K, Fujita Y, Terazawa R, Atsumi Y, Kato T, Nozawa Y, et al. Inhibition of cortactin and SIRT1 expression attenuates migration and invasion of prostate cancer DU145 cells. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*. 2012;19(1):71-9.

34. Kim JE, Chen J, Lou Z. DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature*. 2008;451(7178):583-6.
35. Zhao W, Kruse JP, Tang Y, Jung SY, Qin J, Gu W. Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature*. 2008;451(7178):587-90.
36. Yao Y, Li H, Gu Y, Davidson NE, Zhou Q. Inhibition of SIRT1 deacetylase suppresses estrogen receptor signaling. *Carcinogenesis*. 2010;31(3):382-7.
37. Yu EJ, Kim SH, Heo K, Ou CY, Stallcup MR, Kim JH. Reciprocal roles of DBC1 and SIRT1 in regulating estrogen receptor alpha activity and co-activator synergy. *Nucleic acids research*. 2011;39(16):6932-43.
38. Yao Y, Brodie AM, Davidson NE, Kensler TW, Zhou Q. Inhibition of estrogen signaling activates the NRF2 pathway in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2010;124(2):585-91.
39. Lee H, Kim KR, Noh SJ, Park HS, Kwon KS, Park BH, et al. Expression of DBC1 and SIRT1 is associated with poor prognosis for breast carcinoma. *Human pathology*. 2011;42(2):204-13.
40. Hiraike H, Wada-Hiraike O, Nakagawa S, Saji S, Maeda D, Miyamoto Y, et al. Expression of DBC1 is associated with nuclear grade and HER2 expression in breast cancer. *Experimental and therapeutic medicine*. 2011;2(6):1105-9.
41. Li K, Luo J. The role of SIRT1 in tumorigenesis. *North American journal of medicine & science*. 2011;4(2):104-6.
42. Yi J, Luo J. SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1804(8):1684-9.
43. Brooks CL, Gu W. p53 Activation: a case against Sir. *Cancer cell*. 2008;13(5):377-8.
44. Lee JT, Gu W. SIRT1: Regulator of p53 Deacetylation. *Genes & cancer*. 2013;4(3-4):112-7.
45. Suh JH, Sieglaff DH, Zhang A, Xia X, Cvorov A, Winnier GE, et al. SIRT1 is a direct coactivator of thyroid hormone receptor beta1 with gene-specific actions. *PloS one*. 2013;8(7):e70097.
46. de Jong E, Winkel P, Poelstra K, Prakash J. Anticancer effects of 15d-prostaglandin-J2 in wild-type and doxorubicin-resistant ovarian cancer cells: novel actions on SIRT1 and HDAC. *PloS one*. 2011;6(9):e25192.

47. Li D, Bi FF, Chen NN, Cao JM, Sun WP, Zhou YM, et al. A novel crosstalk between BRCA1 and sirtuin 1 in ovarian cancer. *Scientific reports*. 2014;4:6666.
48. Yuan H, Wang Z, Li L, Zhang H, Modi H, Horne D, et al. Activation of stress response gene SIRT1 by BCR-ABL promotes leukemogenesis. *Blood*. 2012;119(8):1904-14.
49. Sun Y, Sun D, Li F, Tian L, Li C, Li L, et al. Downregulation of Sirt1 by antisense oligonucleotides induces apoptosis and enhances radiation sensitization in A549 lung cancer cells. *Lung cancer*. 2007;58(1):21-9.
50. Chen X, Hokka D, Maniwa Y, Ohbayashi C, Itoh T, Hayashi Y. Sirt1 is a tumor promoter in lung adenocarcinoma. *Oncology letters*. 2014;8(1):387-93.
51. Xiong P, Li YX, Tang YT, Chen HG. Proteomic analyses of Sirt1-mediated cisplatin resistance in OSCC cell line. *The protein journal*. 2011;30(7):499-508.
52. Chauhan D, Bandi M, Singh AV, Ray A, Raje N, Richardson P, et al. Preclinical evaluation of a novel SIRT1 modulator SRT1720 in multiple myeloma cells. *British journal of haematology*. 2011;155(5):588-98.
53. Jung W, Hong KD, Jung WY, Lee E, Shin BK, Kim HK, et al. SIRT1 Expression Is Associated with Good Prognosis in Colorectal Cancer. *Korean journal of pathology*. 2013;47(4):332-9.
54. Kim JR, Moon YJ, Kwon KS, Bae JS, Wagle S, Yu TK, et al. Expression of SIRT1 and DBC1 is associated with poor prognosis of soft tissue sarcomas. *PloS one*. 2013;8(9):e74738.
55. Kang Y, Jung WY, Lee H, Lee E, Kim A, Kim BH. Expression of SIRT1 and DBC1 in Gastric Adenocarcinoma. *Korean journal of pathology*. 2012;46(6):523-31.
56. Zhang B, Chen J, Cheng AS, Ko BC. Depletion of sirtuin 1 (SIRT1) leads to epigenetic modifications of telomerase (TERT) gene in hepatocellular carcinoma cells. *PloS one*. 2014;9(1):e84931.
57. Wilking MJ, Singh C, Nihal M, Zhong W, Ahmad N. SIRT1 deacetylase is overexpressed in human melanoma and its small molecule inhibition imparts anti-proliferative response via p53 activation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014;563:94-100.

58. Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *European journal of cancer*. 2000;36(18):2294-300.
59. Zhou XC, Dowdy SC, Podratz KC, Jiang SW. Epigenetic considerations for endometrial cancer prevention, diagnosis and treatment. *Gynecologic oncology*. 2007;107(1):143-53.
60. Johnstone RW, Licht JD. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target? *Cancer cell*. 2003;4(1):13-8.
61. Ota H, Tokunaga E, Chang K, Hikasa M, Iijima K, Eto M, et al. Sirt1 inhibitor, Sirtinol, induces senescence-like growth arrest with attenuated Ras-MAPK signaling in human cancer cells. *Oncogene*. 2006;25(2):176-85.
62. Pruitt K, Zinn RL, Ohm JE, McGarvey KM, Kang SH, Watkins DN, et al. Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PLoS genetics*. 2006;2(3):e40.
63. Hede K. Histone deacetylase inhibitors sit at crossroads of diet, aging, cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(6):377-9.
64. Lim CS. SIRT1: tumor promoter or tumor suppressor? *Medical hypotheses*. 2006;67(2):341-4.
65. Saúde Nde. Estatísticas de Saúde - Mortalidade 2006 2007 [cited 2008 23 fev]. Available from: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=organograma&cod=17446>.
66. Lurain JR. Câncer Uterino. In: Berek JS, editor. *Novak Tratado de Ginecologia*. 12^a ed1998. p. 749-86.
67. Marques JA. Câncer do corpo do útero: rastreamento, detecção e diagnóstico precoce In: Halbe HW, editor. *Halbe - Tratado de Ginecologia*. 3. 3^a ed2000. p. 2207-11.
68. Rosai J. Female Reproductive System - Uterus: corpus. In: Rosai J, editor. *Rosai and Ackerman's - Surgical Pathology*. 2. 9^a ed2004. p. 1569 – 603.
69. Jiang S, Dowdy SC, Meng XW, Wang Z, Jones MB, Podratz KC, et al. Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis in both Type I and Type II endometrial cancer cells. *Gynecologic oncology*. 2007;105(2):493-500.

70. Bakkum-Gamez JN, Gonzalez-Bosquet J, Laack NN, Mariani A, Dowdy SC. Current issues in the management of endometrial cancer. *Mayo Clinic proceedings*. 2008;83(1):97-112.
71. Guo SW. The endometrial epigenome and its response to steroid hormones. *Molecular and cellular endocrinology*. 2012;358(2):185-96.
72. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2009;105(2):103-4.
73. Morrow CP, Bundy BN, Kurman RJ, Creasman WT, Heller P, Homesley HD, et al. Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology*. 1991;40(1):55-65.
74. Barakat RR, Lev G, Hummer AJ, Sonoda Y, Chi DS, Alektiar KM, et al. Twelve-year experience in the management of endometrial cancer: a change in surgical and postoperative radiation approaches. *Gynecologic oncology*. 2007;105(1):150-6.
75. Watanabe Y, Aoki D, Kitagawa R, Takeuchi S, Sagae S, Sakuragi N, et al. Status of surgical treatment procedures for endometrial cancer in Japan: results of a Japanese Gynecologic Oncology Group survey. *Gynecologic oncology*. 2007;105(2):325-8.
76. Todo Y, Sakuragi N, Nishida R, Yamada T, Ebina Y, Yamamoto R, et al. Combined use of magnetic resonance imaging, CA 125 assay, histologic type, and histologic grade in the prediction of lymph node metastasis in endometrial carcinoma. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2003;188(5):1265-72.
77. Todo Y, Okamoto K, Hayashi M, Minobe S, Nomura E, Hareyama H, et al. A validation study of a scoring system to estimate the risk of lymph node metastasis for patients with endometrial cancer for tailoring the indication of lymphadenectomy. *Gynecologic oncology*. 2007;104(3):623-8.
78. Lax SF, Kendall B, Tashiro H, Slebos RJ, Hedrick L. The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer*. 2000;88(4):814-24.

79. Darvishian F, Hummer AJ, Thaler HT, Bhargava R, Linkov I, Asher M, et al. Serous endometrial cancers that mimic endometrioid adenocarcinomas: a clinicopathologic and immunohistochemical study of a group of problematic cases. *The American journal of surgical pathology*. 2004;28(12):1568-78.
80. Robert A. Soslow CI, Charles Zaloudek. Immunohistology of the femael genital tract. In: Dabbs DJ, editor. *Diagnostic Immunohistochemistry*2002. p. 655-7.