

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
Dissertação de Mestrado

A EXPRESSÃO DA ENZIMA
SIRTUINA 1 (SIRT1)
NO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO

Chrystiane da Silva Marc

Porto Alegre

2008

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
Dissertação de Mestrado

A EXPRESSÃO DA ENZIMA
SIRTUINA 1 (SIRT1)
NO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO

Aluna: Chrystiane da Silva Marc

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Duval da Silva

Co-orientadores: Prof. Dr. José Luiz da Costa Vieira

Prof. Dr. Manoel Afonso Guimarães Gonçalves

Dissertação de Mestrado 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 de Mestre em Medicina.

Porto Alegre
2008

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

M313e Marc, Chrystiane da Silva

A expressão da enzima sirtuina 1 (SIRT1) no câncer de endométrio / Chrystiane da Silva Marc; orient. Vinicius Duval da Silva; co-orient. José Luiz da Costa Vieira e Manoel Afonso Guimarães Gonçalves. Porto Alegre: PUCRS, 2008.
52f.: il. tab.

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

1. NEOPLASIAS DO ENDOMÉTRIO. 2. HISTONA DESACETILASES. 3. COENZIMAS. 4. SIRTUINAS. 5. SIRT1. 6. ESTUDOS DE CASOS E CONTROLES. I. Silva, Vinicius Duval da. II. Vieira, José Luiz da Costa. III. Gonçalves, Manoel Afonso Guimarães. IV. Título.

C.D.D. 618.14

C.D.U. 618.14-006.6:616-008.831(043.3)

N.L.M. WP 458

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia
Bibliotecária CRB10/196

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Silvia Helena e Everton, minha irmã Adriana e meu marido Fabrizio, pela paciência, incentivo e apoio incondicional em todas as etapas da minha vida;

Ao Dr. Vinicius Duval da Silva, que soube me acolher com extrema receptividade e competência, tornando possível a concretização desta longa etapa;

Ao Dr. José Luiz da Costa Vieira, por ter acompanhado todos os passos deste desafio, transmitindo com dedicação e sabedoria todo seu conhecimento e experiência;

Ao Dr. Manoel Afonso Guimarães Gonçalves, pelo exemplo de profissional e por sempre me orientar a trilhar de forma íntegra e correta o árduo caminho da medicina;

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

Ao acadêmico de medicina Felipe Loss, pelo apoio na elaboração das imagens e na realização da análise das amostras;

Ao técnico em histologia Tiago Giuliani Lopes, por tornar possível a realização da parte laboratorial deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de 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
2.3 TERAPIA EPIGENÉTICA.....	11
2.4 INIBIDORES DE HISTONAS DESACETILASES.....	13
2.5 CÂNCER DE ENDOMÉTRIO.....	15
2.5.1 Epidemiologia , fatores de risco e diagnóstico.....	15
2.5.2 Histopatologia e alterações moleculares.....	17
2.5.3 Estadiamento e tratamento cirúrgico.....	19
2.5.4 Tratamento complementar.....	21
2.6 IMUNOHISTOQUÍMICA NO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO.....	23
OBJETIVOS.....	25
2.7 Objetivo Geral.....	25
2.8 Objetivo específico.....	25
3 ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	26
A EXPRESSÃO DA ENZIMA SIRT1 NO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO.....	26
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	29
INTRODUÇÃO.....	30
PACIENTES E MÉTODOS.....	32
Imunohistoquímica.....	33
Método de Contagem.....	34
Análise estatística:.....	34
RESULTADOS:.....	35
DISCUSSÃO:.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (DO ARTIGO).....	45
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

LISTA DE 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 factor</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 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 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.

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)

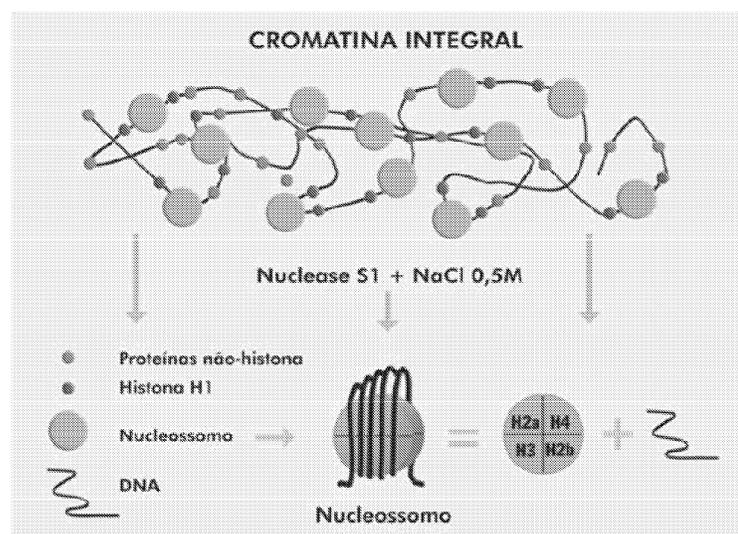


Figura 1: Estrutura da Cromatina (15)

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 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)

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 antienvhecimento. 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 está 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 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; SIRT1 foi capaz de inibir a proliferação das linhagens que expressam AR, mas não teve influência no crescimento das linhagens deficientes;

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

Assim, pode-se concluir que SIRT1 reprime a sinalização e a função dos receptores de androgênios através de ligação direta e desacetilação. A repressão de fatores ativadores, como p300, é um fator adicional à inibição da atividade de AR. Deste modo, há um antagonismo funcional entre SIRT1 e as atividades de AR acetiladas por p300. O aumento da atividade destes receptores, a partir da perda de fatores repressores, tem sido relacionado ao crescimento células tumorais de próstata. A superexpressão, mutações e fatores de ativação de receptores androgênios estão envolvidos na resistência

ao tratamento do câncer de próstata. SIRT1 parece exercer um papel inibitório nestes receptores e promover a regulação da proliferação das células tumorais em próstata.(30)

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.(31)

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 microsátélites apresentam metilação e silenciamento do gene MHL1 (gene de reparo de erro).(12) A

instabilidade de microsátélites é definida pelas inserções ou deleções aberrantes de mono ou dinucleotídeos. Aproximadamente 90% dos tumores de cólon, endométrio e estômago que apresentam instabilidade de microsátélites 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.(31)

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.(31)

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.(32)

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.(33)

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.(34)

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 sirtuinas 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.(35)

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.(36)

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.(37)

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.(38)

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).(39, 40)

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 (40)

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. (39) 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.(40)

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. (41)

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. (41), (42)

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). (43)

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 (41)

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 (quadro 3).

Quadro 3 – Estadiamento cirúrgico do câncer de endométrio – FIGO 1988

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	II A: envolvimento glândulas cervicais (sem invasão estroma) II B: envolvimento do estroma
III. Tumor além do útero, restrito à pelve	III A: invasão da serosa e/ou anexos e/ou citologia peritoneal positiva III B: metástases na pelve (incluindo linfonodos) e/ou linfonodos paraaórticos
IV. Invasão órgãos vizinhos e/ou metástases à distância	IV A: invasão de bexiga e/ou mucosa do intestino IV B: metástases à distância

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 extra-uterinos (metástases anexiais, disseminação pélvica, citologia peritoneal positiva, metástases em linfonodos pélvicos e paraaórticos).(44) 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. (45)

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.(45)

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.(46)

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.(43)

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.(47). 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 (pan-histerectomia 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.(48)

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.(43)

A quimioterapia tem sido utilizada na doença avançada ou recorrente, e possui um papel limitado. Os agentes comumente utilizados incluem a cisplatina e doxorrubicina, 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 doxorrubicina e cisplatina em combinação com outras drogas demonstrou uma melhora na sobrevida global quando comparada com doxorrubicina 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.(43)

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.(49) 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.(50, 51)

OBJETIVOS

2.7 OBJETIVO GERAL

Verificar a expressão da enzima Sirtuina 1 (SIRT1) em amostras histológicas de carcinoma de endométrio e compará-la com a sua expressão em amostras de pacientes com endométrio normal.

2.8 OBJETIVO ESPECÍFICO

Verificar se existe diferença na expressão de SIRT1 de acordo com as características histológicas do tumor (tamanho, grau, tipo histológico, etc).

3 ARTIGO EM PORTUGUÊS

A EXPRESSÃO DA ENZIMA SIRT1 NO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO

**A EXPRESSÃO DA ENZIMA SIRT1
NO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO**

**SIRT1 ENZYME EXPRESSION
IN ENDOMETRIAL CANCER**

Chrystiane da Silva Marc¹
José Luiz da Costa Vieira²
Manoel Afonso Guimarães Gonçalves²
Felipe Loss³
Tiago Giuliani Lopes⁴
Vinícius Duval da Silva²

Correspondência para:

Dra. Chrystiane da Silva Marc, Av Francisco Petuco, n45 apto 901 bloco B1
90520-620, Porto Alegre, RS - Brasil.

Tel: +55 51 99810668; Email: 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 Acadêmico 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).

Objetivos - Identificar, quantificar e comparar a expressão da enzima SIRT1 em amostras de endométrio tumoral e normal.

População e Métodos – Estudo de caso-controle comparando 50 casos de câncer de endométrio e 25 controles (endométrio tipo secretor) 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 dezembro de 2006. Os espécimes em parafina foram submetidos à pesquisa da expressão da enzima SIRT1 através da técnica de imunohistoquímica.

Resultados – A expressão de SIRT1 avaliada pelo percentual médio de positividade nuclear de células foi significativamente maior no grupo controle (95% \pm 6%) em comparação com os casos (63% \pm 28%) ($p < 0,001$), diferença que permaneceu mesmo após ajuste para a idade (respectivamente 91% \pm 33% e 65% \pm 28%, $p = 0,007$). Fatores como grau histológico, tamanho do tumor, tipo histológico e invasão de orifício cervical interno não apresentaram diferenças significativas quanto à expressão de SIRT1.

Conclusão – A expressão imunohistoquímica da histona desacetilase SIRT1 foi significativamente menor nas amostras de neoplasia de endométrio em relação ao endométrio normal.

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

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.

Objective - To identify, quantify and compare SIRT1 expression in normal and neoplastic endometrial tissue.

Methods – Case-control study comparing 50 cases of endometrial cancer and 25 control samples comprised of secretor-type normal endometrium. All samples were selected from the Pathology Service, Hospital Sao Lucas of PUCRS between January, 2000 and December, 2006. All paraffin specimens were submitted to SIRT1 immunostaining protocol.

Results – The expression of SIRT1 was assessed by the mean percentage of cells with positive nuclear staining. The expression of SIRT1 was higher in the control group (95% \pm 6%) as compared to the cancer group (63% \pm 28%) ($p < 0,001$). This difference remained significant even after age adjustment (91% \pm 33% and 65% \pm 28%, $p = 0,007$). Other factors such as histologic grade, tumor size and invasion of internal cervical orifice did not show any significant difference regarding SIRT1 expression.

Conclusion – The immunohistochemical expression of SIRT1 histone deacetylase was significantly lower in endometrial cancer samples as compared to normal endometrium.

Key-words – Endometrial cancer, SIRT1, histone deacetylases

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.

PACIENTES E MÉTODOS

Foi realizado um estudo de caso-controle comparando a expressão da enzima SIRT1 em amostras histológicas adquiridas através do bloco de parafina de pacientes com tumores malignos de endométrio (casos) e em endométrio considerado normal (controles).

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 dezembro de 2006 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, invasão miometrial, invasão de orifício cervical interno, invasão vascular, margem cirúrgica, linfonodos, invasão de outros órgãos e estadiamento cirúrgico.

As amostras histológicas não-neoplásicas (controles) foram obtidas de pacientes submetidas à biópsia de endométrio (por qualquer razão, por exemplo, menorragia) que foram realizadas no mesmo hospital e no mesmo período dos casos. Foram incluídas amostras com resultado histológico normal, excluindo-se além de neoplasia, as lesões hiperplásicas e o desenvolvimento de alguma alteração neoplásica ou pré-neoplásica documentada posteriormente à biópsia.

Foram incluídos no estudo 50 casos de câncer de endométrio e 25 controles (endométrio secretor), constituindo 75 pacientes. A escolha de endométrio secretor foi baseada na baixa taxa de proliferação celular do endométrio nesta fase (há altas taxas de proliferação entre o 8º e o 10º dia do ciclo, com índices próximos a zero no 19º dia).(19) Cada amostra (casos e controles) teve a expressão de SIRT1 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 o anticorpo monoclonal de coelho anti-SIRT1, clone E104 (Abcam-32441), diluído 1:100 em PBS. O método de detecção utilizado para pesquisa de antígenos em tecidos foi avidina-biotina peroxidase. Foram realizados cortes histológicos com 3µm de espessura em micrótomo rotativo Leica RT2150. As lâminas foram desparafinizadas em estufa histológica por 20 minutos com temperatura de 69°C, 2 incubações em xilol por 5 minutos cada, 5 incubações com álcool etílico 99º por 2 minutos cada, lavagem em água corrente até remoção completa do álcool e depois mantidas em tampão PBS. A recuperação antigênica foi realizada utilizando tampão citrato pH 6.0 por 20 minutos em microondas. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de Hidrogênio a 5% em álcool metílico com 2 incubações de 15 minutos cada e o bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com leite em pó desnatado 10% em tampão PBS. A incubação com o anticorpo primário foi realizada em incubadora BOD a 5°C por pelo menos 8h. Para detecção da reação antígeno-anticorpo foi utilizado anticorpo secundário biotinilado e complexo avidina-HRP. A marcação foi realizada utilizando como cromógeno a Diamina Benzidina (DAB, DAKO). Por fim as lâminas foram contra coradas utilizando Hematoxilina de Harris, desidratadas em uma série de álcool etílico 99º, clarificadas em xilol e montadas com bálsamo do Canadá.

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 análise digital das imagens foi utilizado o programa *Image Pro Plus* versão 6.0, que permite a captura digital da imagem, marcação e contagem das células na área de interesse. 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 375 campos analisados (cada área de 400 aumentos corresponde a 19200 μm^2). As células positivas para expressão de SIRT1 foram identificadas pela coloração nuclear marrom, obtendo-se então, um percentual médio de expressão de SIRT1 para cada amostra.

Análise estatística:

A expressão de SIRT1 foi analisada comparando casos e controles, bem como dentro das variáveis histológicas do tumor. Os dados quantitativos foram descritos por média e desvio-padrão. A comparação envolvendo dois grupos foi realizada através do teste t de *Student* e no caso de 3 ou mais grupos por Análise de Variância (ANOVA) com localização de diferenças pelo teste de *post-hoc* de Duncan. A associação entre variáveis quantitativas foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson. Como foi encontrada correlação entre a idade dos pacientes e a expressão de SIRT1, foi realizada análise da relação entre a expressão de SIRT1 em casos e controles com ajuste para idade, através de análise de Covariância (ANCOVA). O nível de significância foi de 0,05. Os dados foram analisados utilizando o programa SPSS versão 11.5.

RESULTADOS:

Os controles foram compostos de 25 amostras de endométrio secretor de pacientes com média de idade de 42,5 anos (desvio-padrão de 7,2 anos). Os casos foram constituídos de 50 amostras de câncer de endométrio de pacientes com média de idade de 66,7 anos (desvio-padrão de 10,9 anos). O resumo da análise descritiva das variáveis histológicas encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Análise descritiva das variáveis histológicas nos casos (n=50)

FATOR	N	Percentual (%)
Tipo histológico tumoral		
Endometrióide	43	86
Sarcoma de estroma	2	4
Endometrióide com áreas viloglandulares	1	2
Viloglandular	1	2
Células Claras	1	2
Misto	1	2
Mülleriano	1	2
Grau tumoral		
1	5	10
2	37	74
3	8	16
Invasão OCI		
Presente	20	40
Ausente	30	60
Invasão vascular		
Presente	5	10
Ausente	45	90
Linfonodos		
Positivos	4	8
Negativos	11	22
Não analisados	35	70
Estadiamento Cirúrgico		
1 A	1	2
1 B	20	40
1 C	7	14
2 A	8	16
2 B	1	2
3 A	3	6
3 B	4	8
4 A	3	6
4 B	3	6

O tipo histológico mais freqüente foi o adenocarcinoma endometrióide (43 casos – 86,0 %). Outros tipos encontrados foram: 2 casos de sarcoma de estroma endometrial, 1 caso de adenocarcinoma endometrióide com áreas viloglandulares, 1 caso de adenocarcinoma viloglandular, 1 caso de tumor mülleriano misto, 1 caso de adenocarcinoma de células claras e 1 caso de tumor misto (endometrióide e células claras). Para análise quanto ao tipo histológico, foram agrupados os adenocarcinomas endometrióides *versus* os demais (células claras, mülleriano misto, sarcoma de estroma endometrial e tumor misto).

Quanto ao grau histológico, 37 casos foram grau 2 (tumores moderadamente diferenciados), 8 casos foram grau 3 (tumores pouco diferenciados) e 5 casos grau 1 (tumores bem diferenciados). A média de tamanho dos tumores foi de 4,3 cm (desvio-padrão de 2,3 cm). Quanto à presença de invasão miometrial: 1 ausente, 7 invasão superficial, 19 invasão metade interna do miométrio, 4 invasão de dois terços do miométrio, 5 invasão total do miométrio e 14 invasão parte externa do miométrio (serosa).

A invasão do orifício cervical interno esteve presente em 40% dos casos (n = 20) e a invasão vascular em 10% (n = 5). A margem cirúrgica foi livre na maioria dos casos (n = 48, 96%). A análise dos linfonodos foi realizada em apenas 15 pacientes (30%), destas 4 apresentaram linfonodos positivos e 11 linfonodos negativos; em 35 casos a análise não foi feita. Quanto ao estadiamento cirúrgico, a maioria dos tumores encontrava-se no estágio 1B (40%).

A expressão de SIRT1 obtida através do percentual médio de positividade de células em cada amostra foi significativamente maior no grupo controle (95% \pm 6%) em comparação com os casos (63% \pm 28%) (p<0,001). As figuras 1 e 2 ilustram a representação da expressão imunohistoquímica de SIRT1 em casos e controles através da coloração nuclear marrom.

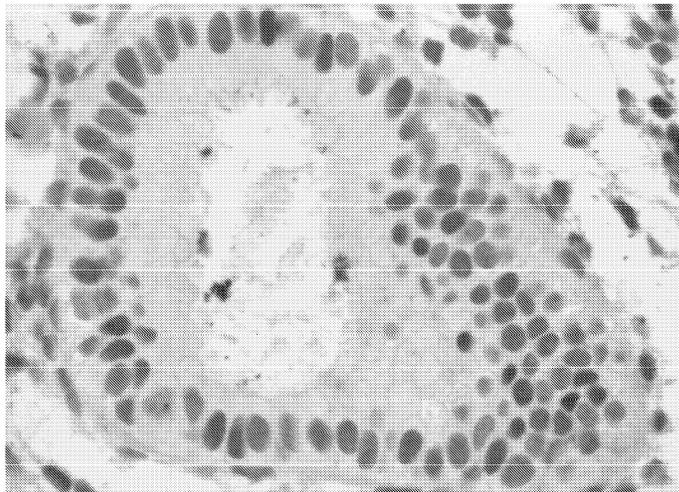


Figura 1- Controle (endométrio secretor)

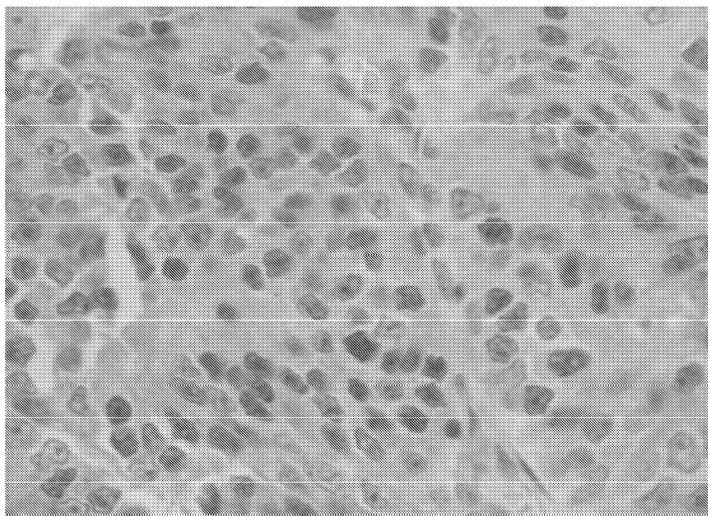


Figura 2- Caso (adenocarcinoma endométrio)

Os dados relativos à expressão de SIRT1 entre os diversos fatores observados estão apresentados na tabela 2. Na comparação do tipo histológico adenocarcinoma endometrióide com outros tipos de neoplasia e com endométrio secretor (controles), a expressão foi maior nos controles do que nas amostras tumorais ($p < 0,001$), contudo, não houve diferença na expressão de SIRT1 de acordo com o tipo histológico tumoral. Fatores como grau histológico, tamanho do tumor e invasão de orifício cervical interno também não apresentaram diferenças significativas quanto à expressão de SIRT1. A expressão de SIRT1 demonstrou uma correlação negativa com a idade ($r = -0,47$), ou seja, quanto maior a idade, menor a expressão (tabela 3). Em virtude

do número restrito de pacientes nos estádios 2, 3 e 4 não foi realizada análise estratificada comparando a expressão de SIRT1 entre os estadiamentos.

Com o intuito de comparar a expressão de SIRT1 entre casos e controles independentemente da idade, foi realizada análise ajustada para essa variável. A diferença na expressão de SIRT1 entre casos e controles se manteve independente da idade ($p=0,007$). As médias brutas e ajustadas seguem na tabela 4.

Tabela 2 – Relação entre percentual de células com expressão de SIRT1 e diversos fatores observados em mulheres com câncer de endométrio e controles

Fator	n	Estatística (%)	p
Grupo			
Controle	25	95 ±6	<0,001
Câncer endométrio	50	63 ±28	
Tipo histológico			<0,001
Controle	25	95 ±6 ^(a)	
Adenocarcinoma Endometrióide	45	63 ±28 ^(b)	
Outros	5	64 ±31 ^(b)	
Grau histológico*			0,76
1	5	54 ±41	
2	37	63 ±29	
3	8	66 ±20	
Invasão de orifício cervical interno*			0,14
Sim	20	70 ±24	
Não	30	58 ±30	

Os dados são apresentados através de média ±desvio padrão. P: significância estatística obtida em ANOVA e t de Student. [*] Informação não disponível para controles. Letras-índice não coincidentes representam diferenças significativas ao teste de post-hoc de Duncan ($P \leq 0,05$).

Tabela 3- Correlação entre idade e tamanho do tumor na expressão de SIRT1

Fator	n	estatística	p
Idade, anos	69	$r = -0,47$	<0,001
Tamanho do tumor (cm)	50	$r = 0,20$	0,17

Os dados são representados através do coeficiente de correlação de Pearson (r).

Tabela 4: Média de percentual de células com expressão de SIRT1 entre casos e controles ajustada para idade

Fator Idade	Controles	Casos	p
Média ± DP brutas	95 ± 6	63 ± 28	<0,001
Média ± DP ajustadas	91 ± 33	65 ± 28	0,007

Os dados são apresentados através de média ± desvio padrão.
P: significância estatística obtida em ANCOVA.

DISCUSSÃO:

Nossos resultados evidenciaram uma menor expressão de SIRT1 nas amostras de câncer de endométrio quando comparadas com controles, independentemente da idade das pacientes.

De forma semelhante aos dados da literatura, a maioria dos tumores em nosso estudo foi do tipo adenocarcinoma endometrióide, em pacientes com média de idade de 66,7 anos, tumores grau 2 e com estadiamento clínico inicial (I B).

Existe uma expressão imunohistoquímica diversa no que se refere à expressão de p53 e receptores hormonais (RE/RP – estrogênio e progesterona) 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)

Uma das explicações para uma menor expressão de SIRT1 em nossos casos pode ser em função do tipo histológico, uma vez que a maioria os tumores são do tipo endometrióide (43 casos – 86%), que estão relacionados a outras alterações moleculares que não envolvem a inativação de p53, o que poderia inferir uma baixa relação com a possível via que relaciona a superexpressão de SIRT1 e a inativação de p53 para o desenvolvimento tumoral. Deste modo, os tumores expressariam menos SIRT1 que os controles. Por outro lado, não houve diferença significativa na expressão de SIRT1 entre as variantes histológicas o que poderia ocorrer em virtude do número restrito de pacientes com tumores não-endometrióides. Uma análise mais completa do perfil de alterações moleculares, receptores hormonais e uma comparação adequada com os diversos tipos histológicos poderia fornecer maiores informações quanto à expressão de SIRT1 nestes tecidos.

Outra forma de interpretar os resultados é que SIRT1 ainda é um fator em estudo e parece estar envolvido em muitas rotas metabólicas e, até mesmo sua atividade em relação ao gene p53 parece não ser absoluta, envolvendo outros fatores nesta interação que acabam por determinar um padrão de crescimento celular em um determinado tecido. Aparentemente a inibição de SIRT1 parece promover a acetilação de p53, mas não alterar a sobrevivência e o crescimento celular.(24)

A fim de verificar os níveis de SIRT1 e envelhecimento foi realizado um estudo com fibroblastos humanos e fibroblastos embrionários de camundongos com envelhecimento normal, acelerado ou retardado. Os níveis de SIRT1 em camundongos caíram rapidamente no envelhecimento precoce e permaneceram elevados no envelhecimento atrasado. Em fibroblastos humanos e em camundongos houve uma correlação positiva entre os níveis de SIRT1 e o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), um fator de processamento de DNA expresso na fase S do ciclo celular, o que indica que SIRT1 está associado à atividade mitótica. Ainda, com o intuito de identificar a expressão de SIRT1 de acordo com tecidos com alta e baixa atividade mitótica ao longo da vida, foi realizada análise de SIRT1 no cérebro, timo e testículos

de camundongos em idade adulta jovem (4 meses) e idosos (12, 18 e 24 meses). A expressão de SIRT1 demonstrou um declínio com a idade em tecidos nos quais há uma diminuição na atividade mitótica ao longo da vida, como timo e testículos. No timo os níveis de SIRT1 e PCNA declinaram significativamente com a idade, o que reflete a regressão do órgão ao longo da vida. Nos testículos os níveis de SIRT1 se mantiveram mais ou menos constantes e sofreram um declínio na população mais idosa, e no cérebro não houve alterações nos níveis de SIRT1 com a idade.(25) Em nosso estudo houve uma correlação negativa entre SIRT1 e idade, ou seja, quanto maior a idade, menor os níveis de SIRT1, o que corrobora os achados desse estudo, uma vez que o endométrio é um tecido altamente mitótico na idade adulta e esta característica regride com o envelhecimento.

Anormalidades no receptor de androgênios (AR) têm sido relacionadas à patogênese e progressão do Câncer de Próstata. A partir dos estudos envolvendo 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 androgênicos, sugerindo um papel de SIRT1 na regulação da acetilação de AR. Além disso, a expressão de SIRT1 reduz os níveis basais de receptores androgênicos 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)

Baseado neste estudo pode-se sugerir que os tumores de endométrio expressam menos SIRT1 que os controles porque, assim como a próstata, são neoplasias hormônios-dependentes e que, deste modo, talvez exista uma

relação entre a anormalidade de receptores hormonais no endométrio carcinomatoso e uma baixa expressão de SIRT1. Se isto ocorrer, como na próstata, os tumores expressam menos SIRT1 permitindo um desbalanço na atividade hormonal. Os controles (endométrio sadio) expressam SIRT1 em um percentual médio de 91% das células, o que pode estar relacionado a um controle hormonal adequado.

Vários 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.(26)

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, Doxorubicina e Carboplatina.(27) 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 sinergisticamente 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.(27) 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 sirtuinas.

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.(28) Isto se deve em parte às características de indução da citodiferenciação, propriedades antiproliferativas e apoptose.(29) 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).(30) 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 (*Psammaphin A*) foi testado em linhagens Ishikawa.(31) 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. (31)

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 sirtuinas.

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 envolvendo outros marcadores, como p53 e receptores hormonais, e outras 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 este tópico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (DO ARTIGO)

- 1 Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science (New York, NY)*. 2001;293:1074-80.
- 2 Taddei A, Roche D, Bickmore WA, Almouzni G. The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anticancer therapy? *EMBO reports*. 2005;6:520-4.
- 3 Cress WD, Seto E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *Journal of cellular physiology*. 2000;184:1-16.
- 4 Archer SY, Hodin RA. Histone acetylation and cancer. *Current opinion in genetics & development*. 1999;9:171-4.
- 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;48:7789-95.
- 6 Grozinger CM, Schreiber SL. Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chemistry & biology*. 2002;9:3-16.
- 7 Lamming DW, Wood JG, Sinclair DA. Small molecules that regulate lifespan: evidence for xenohormesis. *Molecular microbiology*. 2004;53:1003-9.
- 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;97:14178-82.
- 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;107:137-48.
- 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;17:59-67.

- 12 Bordone L, Guarente L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nature reviews*. 2005;6:298-305.
- 13 Yang T, Fu M, Pestell R, Sauve AA. SIRT1 and endocrine signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2006;17:186-91.
- 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;123:437-48.
- 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;26:8122-35.
- 16 Lim CS. SIRT1: tumor promoter or tumor suppressor? *Medical hypotheses*. 2006;67:341-4.
- 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;18:409-20.
- 18 Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429:457-63.
- 19 Rosai J. Female Reproductive System - Uterus: corpus. In: Rosai J, ed. *Rosai and Ackerman's - Surgical Pathology*. 9^a ed 2004:1569 – 603.
- 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;88:814-24.
- 21 Robert A. Soslow CI, Charles Zaloudek. Immunohistology of the female genital tract. In: Dabbs DJ, ed. *Diagnostic Immunohistochemistry* 2002:655-7.
- 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;28:1568-78.

- 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;83:97-112.
- 24 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;26:28-38.
- 25 Sasaki T, Maier B, Bartke A, Scrable H. Progressive loss of SIRT1 with cell cycle withdrawal. *Aging cell*. 2006;5:413-22.
- 26 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;59:2766-9.
- 27 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;5:2767-76.
- 28 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;63:6258-64.
- 29 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;148:896-902.
- 30 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;105:493-500.
- 31 Ahn MY, Jung JH, Na YJ, Kim HS. A natural histone deacetylase inhibitor, Psammalin A, induces cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial cancer cells. *Gynecologic oncology*. 2008;108:27-33.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* (New York, NY. 2001;293:1074-80.
- 2 Taddei A, Roche D, Bickmore WA, Almouzni G. The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anticancer therapy? *EMBO reports*. 2005;6:520-4.
- 3 Cress WD, Seto E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *Journal of cellular physiology*. 2000;184:1-16.
- 4 Archer SY, Hodin RA. Histone acetylation and cancer. *Current opinion in genetics & development*. 1999;9:171-4.
- 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;48:7789-95.
- 6 Grozinger CM, Schreiber SL. Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chemistry & biology*. 2002;9:3-16.
- 7 Lamming DW, Wood JG, Sinclair DA. Small molecules that regulate lifespan: evidence for xenohormesis. *Molecular microbiology*. 2004;53:1003-9.
- 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;107:137-48.
- 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;17:59-67.
- 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;18:409-20.

- 12 Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429:457-63.
- 13 Estrutura e Função dos Cromossomos e Genes. In: Thompson, McInnes, Willard, eds. *Genética Médica* 1993:22-37.
- 14 Harvey AC, Downs JA. What functions do linker histones provide? *Molecular microbiology*. 2004;53:771-5.
- 15 Paulo Leser LECA. Anticorpos Antinucleossomo: Diagnóstico e monitoração do Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) 2004 [Acesso: 23 fev 2008]; Disponível em: [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;3:695-7.
- 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;23:1133-43.
- 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;97:14178-82.
- 19 Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *The Journal of pathology*. 1999;187:112-26.
- 20 Gu W, Roeder RG. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*. 1997;90:595-606.
- 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;107:149-59.
- 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;123:437-48.

- 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;26:28-38.
- 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;97:494-500.
- 25 Gan L, Han Y, Bastianetto S, Dumont Y, Unterman TG, Quirion R. FoxO-dependent and -independent mechanisms mediate SirT1 effects on IGFBP-1 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;337:1092-6.
- 26 Yang T, Fu M, Pestell R, Sauve AA. SIRT1 and endocrine signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2006;17:186-91.
- 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;305:390-2.
- 28 Bordone L, Guarente L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nature reviews*. 2005;6:298-305.
- 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;95:1327-35.
- 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;26:8122-35.
- 31 Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer*. 2000;36:2294-300.
- 32 Zhou XC, Dowdy SC, Podratz KC, Jiang SW. Epigenetic considerations for endometrial cancer prevention, diagnosis and treatment. *Gynecologic oncology*. 2007;107:143-53.
- 33 Johnstone RW, Licht JD. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target? *Cancer cell*. 2003;4:13-8.

- 34 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;25:176-85.
- 35 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:e40.
- 36 Hede K. Histone deacetylase inhibitors sit at crossroads of diet, aging, cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98:377-9.
- 37 Lim CS. SIRT1: tumor promoter or tumor suppressor? *Medical hypotheses*. 2006;67:341-4.
- 38 Saúde Nde. Estatísticas de Saúde - Mortalidade 2006. 2007 [Acesso: 23 fev 2008]; Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/wsa/portal/index.jsp?menu=organograma&cod=17446>.
- 39 Lurain JR. Câncer Uterino. In: Berek JS, ed. *Novak Tratado de Ginecologia*. 12ª ed 1998:749-86.
- 40 Marques JA. Câncer do corpo do útero: rastreamento, detecção e diagnóstico precoce In: Halbe HW, ed. *Halbe - Tratado de Ginecologia*. 3ª ed 2000:2207-11.
- 41 Rosai J. Female Reproductive System - Uterus: corpus. In: Rosai J, ed. *Rosai and Ackerman's - Surgical Pathology*. 9ª ed 2004:1569 – 603.
- 42 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;105:493-500.
- 43 Bakkum-Gamez JN, Gonzalez-Bosquet J, Laack NN, Mariani A, Dowdy SC. Current issues in the management of endometrial cancer. *Mayo Clinic proceedings*. 2008;83:97-112.
- 44 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;40:55-65.
- 45 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;105:150-6.

46 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;105:325-8.

47 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;188:1265-72.

48 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;104:623-8.

49 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;88:814-24.

50 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;28:1568-78.

51 Robert A. Soslow CI, Charles Zaloudek. Immunohistology of the femael genital tract. In: Dabbs DJ, ed. *Diagnostic Immunohistochemistry* 2002:655-7.