

**UNIVERSITATEA DE MEDICINA SI FARMACIE “CAROL
DAVILA”
FACULTATEA DE MEDICINA**

**Teză de Doctorat
(rezumat)**

***Cercetări morfopatologice asupra endometrului si mucoasei
vaginale la femeile in postmenopauză in cadrul terapiei
substitutive hormonale (TSH)***

**Doctorand
Dana Cristina Terzea**

**Conducător științific
Prof. Univ.dr. Paul Nicolescu**

Bucuresti 2007

Cuprins

Introducere

Obiectivele studiului

Material si metode

Rezultate si discutii:

- *Analiza histopatologica si citologica*
- *Studiul imunohistochimic*
- *Analiza ultrastructurala*
- *Studiul fenomenului apoptotic*
- *Analiza statistica a cazurilor studiate*

Concluzii

Cuvinte cheie

Endometru, mucoasa vaginala, postmenopauza, aspecte citologice si morfopatologice, terapie substitutiva hormonala (TSH), imunohistochimie, receptori hormonali, oncoproteine, angiogeneza, apoptoza, TUNEL, microscopie electronica

Introducere

Climacteriul este perioada de tranzitie intre faza reproductiva a vietii femeilor si senescenta. Termenul are originea in limba greaca si are semnificatia unui moment de intoarcere, rascruce sau punct de cotitura. Termenul de menopauza este preferat si folosit in mod frecvent dar menopauza reprezinta doar o faza a climacteriului feminin si consta in oprirea definitiva a menstrelor. A fost propus termenul de tranzitie menopauzala pentru inlocuirea climacteriului.

Menopauza din punct de vedere clinic este ultimul stadiu al unui proces biologic gradat care este initiat prin aparitia de modificari hormonale si reprezinta oprirea permanenta a menstrelor. Acest proces apare de obicei intre 45-55 ani si este considerat complet dupa 6 luni de amenoree. Datorita cresterii sperantei de viata la 80 ani, o femeie traieste o treime din viata ei dupa menopauza.

Declinul ovarian prin scaderea numarului de receptori pentru gonadotropine si reducerea numarului de foliculi ovarieni scade productia de hormoni steroizi. Insuficienta hormonilor steroizi determina aparitia de modificari secundare: vasomotorii, osteoporoza, modificari genito-urinare cu scaderea elasticitatii si grosimii mucoasei vaginale, modificari ale tesuturilor tractului urinar (pierderea elasticitatii si incontinenta), cresterea incidentei afectiunilor cardio-vasculare si a accidentelor cerebrale, modificari neuroendocrine, modificari tegumentare si ale pilozitatii. Datorita impactului major, social si medical, al acestor modificari secundare *se recomanda terapia substitutiva hormonala pentru cresterea calitatii vietii femeilor dupa menopauza.*

Terapia substitutiva hormonala (TSH) are efecte pe termen scurt sau lung, curative si profilactice . Recomandarea terapiei se poate intinde pe o perioada de 15-20 ani.

Terapia se poate face cu schemă unică sau combinată, secvențială sau continuă și influențează mucoasa endometrială și vaginală, cu efect asupra celulelor epiteliale, celulelor stromale și asupra vascularizației.

Terapia substitutiva hormonala cu schema unica, cu preparate care contin estradiol sau estrogeni conjugati, fara administrare de progestative, a fost asociata cu cresterea riscului de aparitie a carcinomului endometrial. Pentru a inlatura acest risc s-a introdus terapia cu schema combinata, cu adaugarea de progestative care induc transformarea secretorie a endometrului, urmata de instalarea hemoragiei de privatiune.

Receptorii pentru estrogeni se gasesc la nivel nuclear in celulele epiteliale, stromale si mioepiteliale. Receptorii pentru progesteron se gasesc la nivel nuclear in celulele epiteliale si stromale; nu se gasesc in celulele mioepiteliale.

Utilizarea estriolului in locul estradiolului duce la scaderea riscului de aparitie a hiperplaziilor de endometru datorita afinitatii foarte scazute de cuplare cu receptorul endometrial (aproximativ 10%

din capacitatea de cuplare a estradiolului); de asemenea estriolul este deosebit de activ asupra mucoasei vaginale, avand afinitate egala de cuplare pentru receptorul mucoasei vaginale ca si estradiolul. Cuplarea cu receptorul endometrial este de foarte scurta durata, astfel incat nu produce proliferare endometrială, dar este suficienta pentru instalarea modificarilor trofice vaginale.

Estrogenii care se administreaza pot fi:

- naturali (estrone, estradiol, estrogeni conjugati)
- estrogeni sintetici
- estrogeni nonsteroidali

Progesteronul administrat poate fi natural sau de sinteza.

Prin cresterea sperantei de viata media supravietuirii dupa instalarea menopauzei este de aproximativ 30 ani, astfel incat impactul social si medical datorat modificarilor secundare din postmenopauza este foarte mare; terapia substitutiva hormonală poate fi recomandata tuturor femeilor care nu prezinta o contraindicație majora pentru efectuarea terapiei.

Aceasta teza de doctorat reprezinta continuarea unui studiu pe care l-am efectuat in 1998 asupra modificarilor morfopatologice ale vascularizatiei mucoasei vaginale la femeile in postmenopauza sub influenta tratamentului local hormonal, cu estriol. Preparatele studiate, la acea data, (biopsiile vaginale) au fost analizate histopatologic si imunohistochimic, iar datele obtinute au fost prelucrate cu un program computerizat de analiza de imagine (Lucia M) urmarindu-se parametrii: densitate numerica a elementelor vasculare pe unitatea de suprafata, fractia de arie, suprafata medie a elementelor vasculare, diametrul echivalent, elongatia, circularitatea, grosimea vaselor. Rezultatele studiului au aratat ca in urma terapiei locale cu estriol la nivel vaginal apare neoangiogeneza: creste numarul de vase pe unitatea de suprafata, apar neocapilare si muguri vasculari, creste circularitatea si scade elongatia, ceea ce ar putea explica singurarea vaginala de la inceputul terapiei substitutive, singurarea care dispare dupa tratament indelungat. De asemenea s-a observat ca estriolul are efecte pozitive si asupra epiteliului vaginal si asupra corionului.

Obiectivele tezei de doctorat:

- observarea in dinamica a modificarilor morfopatologice la nivel endometrial si la nivelul mucoasei vaginale la pacientele cu TSH
- studiul imunohistochimic al receptorilor hormoni (ER si PGR), factorilor implicati in angiogeneza (EGFR, FVIII, ACT, MMP2 si MMP9), al membranelor celulare (colagen IV) si oncoproteinelor p53 si bcl2
- studiul aspectelor ultrastructurale ale mucoasei endometriale la pacientele cu TSH
- cuantificarea fenomenului apoptotic prin hibridizare in situ la nivel endometrial la pacientele cu TSH

- analiza citologica a frotiurilor cervico-vaginale recoltate la pacientele cu TSH
- implementarea de metode moderne de diagnostic (imunohistochimie si biologie moleculara) pentru obtinerea unui diagnostic de o mai mare acuratete
- coroborarea datelor de morfopatologie, imunohistochimie, de ultrastructura si biologie moleculara cu evolutia clinica a pacientelor pentru instituirea unei terapii substitutive hormonale adecvate si la depistarea precoce a eventualelor transformari patologice.

S-au urmarit aspectele morfopatologice, imunohistochimice, ultrastructurale si de biologie moleculara endometriale si ale mucoasei vaginale preterapie si pe biopsii repetate sub terapie substitutiva hormonală, aspecte care au fost comparate cu loturi martor netratate si cu datele existente in literatura de specialitate.

Cercetarea si evaluarea modificarilor imunomorfologice la nivelul mucoasei endometriale si vaginale in cadrul terapii substitutive stau la baza modularii terapii si permit depistarea precoce a eventualelor modificari patologice.

Material si metode

Studiul prospectiv s-a realizat pe o perioada de 6 ani (ianuarie 1999- decembrie 2005) si a cuprins un numar de initial de 82 paciente care au primit terapie hormonală substitutivă (TSH); de la 23 paciente s-au prelevat biopsii din mucoasa vaginală si de la 59 paciente selectate in lotul de studiu s-au prelevat initial biopsii in mucosa endometrială; biopsiile endometriale la pacientele selectate in lotul de studiu au fost repetate la intervale prestabilite de la inceperea terapii.

Materialul utilizat a fost reprezentat de frotiuri citologice, cu material recoltat din fundul de sac vaginal si de biopsii din mucoasa endometrială si vaginală fixate in formol salin, tamponat 10% si incluse la parafina.

Frotiuri cervico-vaginale, biopsii din mucosa vaginală si din mucosa endometrială au fost recoltate preterapie, la 6 luni, la 12 luni si la 24 luni de la inceperea terapii.

Materialul a fost furnizat de catre Spitalul clinic “Dr. I. Cantacuzino”- clinica de ginecologie, Institutul de endocrinologie “C.I. Parhon” Bucuresti si de catre INCD “Victor Babes” Bucuresti..

Examinarea frotiurilor citologice, analiza histopatologica, studiile de imunohistochimie, analiza ultrastructurală si testele de medicina moleculară (hibridizare in situ) au fost efectuate in Laboratorul de histopatologie si medicina moleculară al INCD” Victor Babes” Bucuresti.

In vederea examinarii citologice frotiurile au fost colorate cu metoda Papanicolaou si pentru examinarea preparatelor histopatologice s-a folosit coloratiile cu hematoxilina-eozina si van Gieson.

Structurarea lotului de lucru a fost stabilită dupa investigatii clinice, paraclinice si biologice la pacientele aflate in postmenopauza:

→examen clinic

- mamografie
- ecografie cu sonda cu pol vaginal
- investigatii serologice hormonale
- profil lipidic
- glicemie
- investigarea functiei hepatice
- osteodensitometrie

Lotul de studiu a fost format din 82 de paciente care au primit terapie substitutiva hormonală. S-au prelevat frotiuri cervico-vaginale de la toate pacientele cu TSH. De la 23 de paciente s-au prelevat biopsii din mucoasa vaginală și de la 59 de paciente biopsii din mucoasa endometrială.

Loturile martor au fost alcătuite din 168 paciente; dintre acestea 37 paciente alcătuiesc lotul martor pentru biopsiile vaginale și 131 paciente alcătuiesc lotul martor pentru biopsiile endometriale.

Loturile martor pentru biopsiile din mucoasa vaginală au fost alcătuite din 37 paciente cu vârste cuprinse între 35 și 75 ani, structurat în subgrupe martor de studiu: 5 paciente cu vârste între 35-40 ani, 15 paciente cu vârste între 41-50 ani, 9 paciente cu vârste între 51-60 ani și 8 paciente cu vârste între 60-75 ani.

Loturile martor pentru biopsiile din mucoasa endometrială a fost alcătuit din 131 paciente, structurat în subgrupe martor de studiu: 6 paciente cu vârste între 15-20 ani, 25 paciente cu vârste între 21-30 ani, 25 paciente cu vârste între 31-40 ani, 25 paciente cu vârste între 41-50 ani, 25 paciente cu vârste între 51-60 ani și 25 paciente cu vârste peste 61 ani (cea mai în vârstă pacienta din lotul martor are 83 ani).

Terapia substitutivă hormonală (TSH) administrată a fost cu schema combinată (estrogen-progestativă) și unică.

Administrarea pe cale orală a preparatelor este urmată de metabolizare primară hepatică și secundară de transport periferic și se preferă pentru terapia osteoporozei, bolilor cardiovasculare, modificărilor tegumentare și ale pilozității.

Administrarea locală, vaginală se recomandă, în primul rând, pentru reducerea atrofiei urogenitale.

Colorația Babes-Papanicolaou și Giemsa

Colorația Babeș Papanicolaou (pentru frotiuri cervico-vaginale) :

Folosește ca substrat celule exfoliate din epiteliul cervico-vaginal.

Coloratia hematoxilina-eozina si van Gieson

Pentru examinarea la microscopul optic utilizate au fost colorațiile histo-patologice standard HE – hematoxilină eozină și van Gieson .

Analiza histopatologică am realizat-o pe biopsii fixate în formol 10%, prelucrate, incluse la parafina și secționate (3-5 μm) pentru colorațiile histopatologice mai sus menționate.

Colorațiile histopatologice standard :

Colorația hematoxilină – eozină (HE) utilizează drept coloranți hemalaunul Meyer (colorant bazic) și eozina (colorant acid - de fond); ca rezultate, nucleul se colorează albastru-violet, iar citoplasma - roz-roșu.

Colorația van Gieson utilizează drept coloranți hematoxilina Weigert, acidul picric și fuxina acidă; ca rezultate, nucleul se colorează în negru, citoplasma în galben și collagenul în roșu.

Metoda de imunhistochimie (IHC) si anticorpii folositi in studiu

Metoda imunohistochimica (IHC):

S-a utilizat metoda IHC indirecta trisadiala Avidina-Biotina-Peroxidaza (ABC) dupa Hsu S.M., Raine L., Fanger H.: “Use of ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures” J. Histochem. Cytochem. 1981, 29, 577-580, modificata de Bussolati si Gugliotta 1983.

Tehnica se bazează pe metoda indirectă a complexelor imune circulante PAP (peroxidază – antiperoxidază) introdusă prima oară de Ludwig Sternberger în 1970 .

Pentru asigurarea acurateții IHC, a fost efectuat controlul intern de calitate conform unui sistem certificat de asigurare al calității (ISO 9001/2001).

Anticorpi utilizati si parametrii de lucru au fost:

ANTICORPI	CLONA	SPECIFICITATE	SURSA	DILUTIE
Receptori pt. Estrogeni (ER)	1D5	Monoclonal	DAKO, Glostrup Danemarca	1:200
Receptori pt. Progesteron (PGR)	PR88	Monoclonal	BioGenex, San Ramon, Ca, USA	1:200
Oncoproteina Bcl2	124	Monoclonal	DAKO, Glostrup Danemarca	1:100
Oncoproteina P53	DO-7	Monoclonal	DAKO, Glostrup Danemarca	1:50
Colagen IV	CIV22	Monoclonal	DAKO, Glostrup Danemarca	1:50
Factorul VIII	F8/86	Monoclonal	DAKO, Glostrup Danemarca	1:50
EGFR	29.1	Monoclonal	SIGMA, St. Louis Mo, USA	1:1000
ACT	1A4	Monoclonal	SIGMA, St. Louis Mo, USA	1:400
MMP-2	Ab-4 (A-Gel VC2)	Monoclonal	LAB VISION NeoMarkers Fremont, USA	1:500
MMP-9	Ab-9	Policlonal	LAB VISION NeoMarkers Fremont, USA	1:200

Pentru evidentiarea modificarilor structurilor epiteliale si vasculare (evidentiarea angiogenezei), la nivel vaginal, la pacientele care au beneficiat de terapie hormonala substitutiva fata de pacientele netratate, am efectuat teste imunohistochimice utilizand : receptori hormonal (pentru estrogeni ER

si progesteron PGR), factori vasculari si implicati in angiogeneza (factor VIII , ACT- actina muschiului neted, EGFR- Epidermal Growth Factor Receptor, MMP-metaloproteinaze), factori implicati in apoptoza (oncoproteinele p53 si bcl2), collagenIV (component al membranelor celulare).

Metoda pentru examinarea ultrastructurala (microscopie electronica)

S-a utilizat metoda de microscopie electronica clasica care se bazeaza pe aceleasi principii din microscopia optica, de fixare si incluzionare a probelor. Examinarea s-a realizat la microscopul electronic Philips ME 301.

Metoda de biologie moleculara

Metoda hibridizării in situ:

Principiul general al hibridizării este următorul: dacă o soluție de ADN bicatenar este supusă unei temperaturi de aproape 100 grade Celsius, legăturile de hidrogen care sunt legături energetice slabe, se rup, coeziunea dintre moleculele de ADN nu va mai fi asigurată și cele două brațe se separă - este denaturarea ADN-ului. Acest fenomen poate fi reversibil dacă soluția de ADN care de curând a fost încălzită, va fi răcită lent, brațele complementare se vor putea reîntâlni și structura bicatenară se va reface. Două molecule de ADN denaturate, de origine diferită, amestecate în condiții identice, nu vor putea forma molecule hibride decât dacă dețin secvențe complementare.

Pe cazurile selectate am studiat expresia apoptozei determinate prin reacția de hibridizare in situ.

Hibridizarea in situ prin reacția TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling)- marcarea enzimatică in situ a fragmentării ADN indusă prin apoptoză.

S-a folosit Kit (Roche) pentru detectarea imunohistochimică și cuantificarea apoptozei la nivelul unei singure celule, bazate pe marcarea fragmentării ADN: analiză prin microscopie optică.

Procedura de lucru a folosit metoda descrisă de Sgone și col., cu unele modificări efectuate în laboratorul de histopatologie si medicina moleculara a Institutului “Victor Babeș”.

Metoda de analiza statistica

Datele au fost analizate statistic folosind programul Analysis Tool Pak din Microsoft Excel 2003 sub Windows XP Professional. Au fost utilizate teste de statistică descriptivă, testul parametric t-Student și teste de corelație și regresie.

Rezultate si discutii:

Analiza histopatologica si citologica a cazurilor studiate

Analiza histopatologica a biopsiilor a urmarit aspectele celulelor epiteliale, celulelor stromale, vascularizatiei si prezenta elementelor celulare inflamatorii in stroma.

La nivel vaginal s-au urmarit aspectele:

- epiteliu: acantoza moderata (Am), acantoza marcata (AM), atrofie (a) si hiperplazia stratului bazal (Hb)
- stroma: proliferare fibroblasto-fibrocitara marcata (PM), proliferare fibroblasto-fibrocitara moderata (Pm), fibroza (F), prezenta elementelor inflamatorii (I)
- vascularizatie: numar mare de vase (Nv), numar mic de vase (nv), prezenta sufuziunilor sangvine (S)

Tabel :

Vagin	Epiteliu				Stroma				Vascularizatie		
	Am	AM	A	Hb	PM	Pm	F	I	Nv	nv	S
TSH	8	15	-	3	10	11	2	23	23	-	1
LM1	1	4	-	1	1	4	-	4	4	2	-
LM2	10	6	-	3	8	3	5	12	8	8	-
LM3	3	1	4	-	2	1	5	7	2	6	-
LM4	4	-	4	-	-	2	6	4	1	7	1

TSH= lotul de paciente tratate la 6 luni de la inceperea terapiei (23 biopsii); LM1= lot martor 35-40 ani (5 biopsii); LM2= lot martor 41-50 ani (16 biopsii); LM3= lot martor 51-60 ani (8 biopsii); LM4= lot martor 61-75 ani (8 biopsii)

La nivel endometrial s-au urmarit aspectele :

- epiteliu glandular din punct de vedere citologic si arhitectural: aspecte in limite normale in raport cu varsta (N), hiperplazie glandulara simpla fara atipii (HG), atrofie (a), proliferare dezordonata (Pd), slab proliferativ (Sp)
- stroma: proliferare fibroblasto-fibrocitara marcata (PM), proliferare fibroblasto-fibrocitara moderata (Pm), fibroza (F), prezenta elementelor inflamatorii (I)
- vascularizatie: numar mare de vase (Nv), numar mic de vase (nv), prezenta sufuziunilor sangvine (S)

Tabel :

Endom	Glande					Stroma				Vascularizatie		
	N	HG	a	Pd	Sp	PM	Pm	F	I	Nv	nv	S
PT	-	2	26	8	23	33	21	5	16	12	47	18
TSH1	-	3	24	13	19	39	20	-	11	39	20	4
TSH2	-	2	19	3	23	25	22	-	14	32	15	8
TSH3	-	1	6	2	16	12	13	-	10	17	9	
LM1	3	3	-	-	-	-	6	-	2	6	-	2
LM2	14	9	-	-	2	-	25	-	13	19	6	4
LM3	15	9	-	-	1	12	13	-	20	17	8	15
LM4	8	4	3	4	6	13	10	2	15	12	13	4
LM5	2	-	9	4	10	16	7	2	14	4	21	10
LM6	-	-	17	1	7	18	1	6	18	3	22	2

TSH1= lotul de paciente tratate (59 biopsii) la 6 luni de la inceperea terapiei; TSH2=lotul de paciente tratate la 12 luni de la inceperea terapiei (47 biopsii); TSH3= lotul de paciente tratate la 24 luni de la inceperea terapiei (25 biopsii) ; PT= lotul de paciente preterapie (59 biopsii); LM1= lotul martor 15-20 ani (6 biopsii); LM2= lotul martor 21-30 ani (25 biopsii); LM3= lotul martor 31-40 ani (25 biopsii); LM4= lotul martor 41-50 ani (25 biopsii); LM5= lotul martor 51-60 ani (25 biopsii); LM6= lotul martor 61-83 ani (25 biopsii).

Din analiza histopatologica a loturilor de studiu s-a observat:

I. La nivel vaginal terapia substitutiva hormonală a dus la:

- creșterea grosimii epiteliului la toate pacientele , prin creșterea numărului de straturi celulare
- apariția hiperplaziei de strat bazal pe 3 biopsii (15,2%)
- proliferare fibroblasto-fibrocitara pe 21 biopsii (91,3%), în timp ce fibroza s-a observat doar pe 2 biopsii (8,69%)
- elementele inflamatorii au fost prezente la toate pacientele
- număr crescut de vase , în special de neoformate, sunt prezente la toate pacientele tratate

II. La nivel endometrial terapia substitutiva hormonală cu evaluare la 6 luni de la începerea terapiei a dus la:

- aspecte glandulare cu proliferare normală/ slab proliferativ pe 19 biopsii (32,2%)
- aspecte de hiperplazie glandulară simplă fără atipii (HG) pe 3 biopsii (5,08%)
- aspecte de endometru atrofic s-au constatat pe 24 biopsii (40,6%)
- proliferarea marcată fibroblasto-fibrocitara s-a observat pe 39 biopsii (66%) , fără a se constata nici un caz cu fibroză; unele biopsii au prezentat zone laxe în corion , cu aspect decidualiform
- elementele inflamatorii sunt prezente pe 11 biopsii (18,6%)
- creșterea numărului de vase, în special de neoformare, pe 39 biopsii (66%)

III. La nivel endometrial terapia substitutiva hormonală cu evaluare la 12 luni de la începerea terapiei a dus la:

- aspecte glandulare cu proliferare normală/ slab proliferativ pe 23 biopsii (48,9%) , în timp ce aspecte atrofice s-au constatat pe 19 biopsii (40,6%)
- aspecte de hiperplazie glandulară simplă fără atipii s-a observat pe 2 biopsii (4,25%)
- proliferarea marcată fibroblasto-fibrocitara s-a observat pe 39 biopsii (82,9%) , fără a se constata nici un caz cu fibroză; unele biopsii au prezentat în corion zone laxe decidualiforme
- elementele inflamatorii sunt prezente pe 11 biopsii (23,4%)
- creșterea numărului de vase, în special de neoformare, pe 39 biopsii (82,9%)

IV La nivel endometrial terapia substitutiva hormonală cu evaluare la 24 luni de la începerea terapiei a dus la:

- aspecte glandulare cu proliferare normală/ slab proliferativ pe 16 biopsii (64%), în timp ce aspecte atrofice s-au constatat pe 6 biopsii (24%)
- aspecte de hiperplazie glandulară simplă s-au observat pe 1 biopsie (4%)
- proliferarea marcată fibroblasto-fibrocitara s-a observat pe 12 biopsii (48%) , fără a se constata nici un caz cu fibroză
- elementele inflamatorii sunt prezente pe 10 biopsii (40%)
- creșterea numărului de vase cu sufuziuni sanguine în corion pe 17 biopsii (64%)

Evaluarea citologică la pacientele cu terapie substitutivă hormonală (TSH):

La pacientele cu biopsii vaginale :

Tabel :

Vagin	Examen cervico-vaginal	
	CV tip II	CV tip III
TSH	22	1
LM1	5	-
LM2	15	1
LM3	8	1
LM4	8	1

TSH= lot paciente tratate (23 frotiuri); LM1=lot martor 35-40 ani (5 frotiuri); LM2= lot martor 41-50 ani (16 frotiuri); LM3=lot martor 51-60 ani (8 frotiuri); LM4= lot martor 61-75 ani (8 frotiuri)

La pacientele cu biopsii endometriale :

Tabel :

Endometru	Examen cervico-vaginal		
	CV tip II	CV tip III	CV tip IV
TSH	55	1	-
LM1	4	-	-
LM2	22	2	-
LM3	17	3	-
LM4	18	1	-
LM5	14	1	1
LM6	16	4	-

TSH= lot de paciente cu TSH (56 frotiuri); LM1= lot martor 15-20 ani(4 frotiuri); LM2= lot martor 21-30 ani (24 frotiuri); LM3= lot martor 31-40 ani (20 frotiuri); LM4= lot martor 41-50 ani (19 frotiuri); LM5= lot martor 51-60 ani (16 frotiuri); LM6= lot martor 61-83 ani (20 frotiuri)

Din analiza frotiurilor citologice se observa ca:

- I. La pacientele cu tratament substitutiv hormonal cu biopsii vaginale:
 - apar frotiuri de CII si CIII
 - predomina frotiurile CII in proportie de 95,6% (22 frotiuri) la pacientele la care s-a efectuat examen cervico-vaginal, in timp ce frotiurile CIII sunt in proportie de 4,4% (1 frotiu)
- II. La pacientele netratate cu biopsii vaginale:
 - apar frotiuri CII si CIII
 - predomina frotiurile CII : 100% (5 frotiuri) la pacientele din grupa de varsta 35-40 ani, 75% (15 frotiuri si 8 frotiuri) la pacientele din grupele de varsta 41-50 ani si 51-60 ani si 66,66% (8 frotiuri) la pacientele din grupa de varsta 61-75 ani.
- III. La pacientele cu tratament substitutiv hormonal cu biopsii endometriale:
 - apar frotiuri CII si CIII
 - predomina frotiurile CII in proportie de 98,2% (55 frotiuri) , iar frotiurile CIII sunt in proportie de 1,8% (1 frotiu)
- IV. La pacientele netratate cu biopsii endometriale:
 - apar frotiuri CII, CIII si CIV
 - predomina frotiurile CII: la grupa de varsta 21-30 ani 22 frotiuri (proportie de 80%), la grupa de varsta 31-40 ani 17 frotiuri (proportie de 66,6%), la grupa de varsta 41-50 ani 18 frotiuri (proportie de 88,8%) si in grupa de varsta 51-60 ani 16 frotiuri (proportie de 83,3%)
 - se observa numai frotiuri CII in grupa de varsta 15-20 ani (proportie de 100%)
 - frotiurile CII se observa pe 16 frotiuri (80%) in grupa de varsta 61-83 ani
 - apare un singur frotiu CIV la gupa de varsta 51-60 ani (proportie de 16,7%)

Studiul imunohistochimic

Testele imunohistochimice efectuate, pe biopsiile din mucoasa endometrială, din lotul de studiu, au urmarit evaluarea receptorilor hormonali (estrogeni si progesteron), aspecte ale vascularizatiei, aspecte ale membranelor celulare si ale apoptozei celulare.

Testele imunohistochimice efectuate pe biopsiile endometriale din lotul de studiu (56 biopsii) **la 6 luni** de la inceperea terapiei au aratat:

Receptorii pentru estrogeni (ER) pe biopsiile endometriale din lotul de studiu de 56 biopsii la 6 luni de la inceperea terapiei substitutive hormonale au aratat pozitivitate:

- la nivelul celulelor epiteliale glandulare: intre 60-80% - 24 biopsii (42,8%); intre 40-60% - 18 biopsii (32,1%); intre 20-40% - 14 biopsii (25%)
- la nivelul celulelor stromale: intre 60-80% - 8 biopsii (14,2%); intre 40-60% - 24 biopsii (42,8%); intre 20-40% - 18 biopsii (32,1%); intre 1-20% - 6 biopsii (10,7%)

Receptorii pentru progesteron (PGR) pe biopsiile endometriale din lotul de studiu la 6 luni de la inceperea terapiei substitutive au aratat pozitivitate:

- la nivelul celulelor epiteliale glandulare: intre 60-80% - 19 biopsii (33,9%); intre 40-60% - 16 biopsii (28,5%); intre 20-40% - 5 biopsii (8,9%); intre 1-20% - 8 biopsii (14,2%); negativ – 8 biopsii (14,2%)

- la nivelul celulelor stromale : intre 60-80% - 8 biopsii (14,2%); intre 40-60% - 12 biopsii (21,4%); intre 20-40% - 10 biopsii (17,8%); intre 1-20% - 14 biopsii (25%); negativ – 12 biopsii (21,4%).

EGFR pe biopsiile endometriale din lotul de studiu, la 6 luni de la inceperea terapiei substitutive, a aratat pozitivitate la nivelul peretilor vasculari pe 38 biopsii (60,8%) (fig.56) , iar dintre aceste cazuri numar crescut de vase s-au observat pe 28 biopsii (50%).

Factorul VIII pe biopsiile endometriale din lotul de lucru, la 6 luni de la inceperea terapiei substitutive hormonale, a aratat pozitivitate la nivel vascular doar pe 10 biopsii (17,8%).

Actina (ACT) pe biopsiile endometriale din lotul de studiu, la 6 luni de la inceperea terapiei substitutive hormonale, a aratat pozitivitate la nivelul peretilor vasculari (vase de calibru variabil) pe 30 biopsii (53,6%)

Oncoproteina P53 pe biopsiile endometriale din lotul de lucru, la 6 luni de la inceperea terapiei substitutive hormonale, a aratat pozitivitate pe 3 biopsii (5,3%) la nivelul celulelor epiteliale glandulare si la nivelul celulelor stromale in proportie de 5-10%.

Oncoproteina bcl2 pe biopsiile endometriale din lotul de lucru, la 6 luni de la inceperea terapiei substitutive hormonale, a prezentat pozitivitate zonal la nivel glandular pe 10 biopsii (17,8%).

Colagen IV pe biopsiile endometriale din lotul de lucru, la 6 luni de la inceperea terapiei substitutive hormonale, a aratat pozitivitate la nivelul peretilor vasculari si la nivelul membranelor bazale ale structurilor glandulare pe 12 biopsii (21,4%).

MMP-2 pe biopsiile endometriale din lotul de lucru, la 6 luni de la inceperea terapiei substitutive hormonale, a aratat pozitivitate la nivelul peretilor vasculari, zonal, cu intensitate diferita, la nivelul celulelor epiteliale glandulare, celulelor stromale si la nivelul elementelor inflamatorii stromale pe 32 biopsii (57,14%).

MMP-9 pe biopsiile endometriale din lotul de lucru, la 6 luni de la inceperea terapiei substitutive hormonale, a aratat pozitivitate la nivelul peretilor vasculari, zonal intens la nivelul celulelor epiteliale glandulare, celulelor stromale si la nivelul elementelor inflamatorii stromale pe 50 biopsii (89,28%); reactia MMP-9 a fost mult mai intens exprimata la nivel endometrial decat MMP-2.

Testele imunohistochimice efectuate pe un numar de 23 biopsii din mucoasa vaginala la pacientele cu terapie substitutiva hormonala (TSH) au urmarit receptorii hormonali (estrogeni si progesteron), aspecte ale vascularizatiei si ale apoptozei celulare.

Receptorii pentru estrogeni pe biopsiile vaginale din lotul de lucru de 23 biopsii au aratat pozitivitate la nivelul celulelor epiteliale din stratul bazal, parabazal si intermediar in frecvente celule pe 10 biopsii (43,4%).

Receptorii pentru progesteron pe biopsiile vaginale din lotul de lucru de 23 biopsii au aratat pozitivitate la nivelul celulelor epiteliale si stromale, in frecvente celule, pe 12 biopsii (50,2%).

Factorul VIII pe biopsiile vaginale din lotul de lucru a aratat pozitivitate, in toate cazurile, in pereti vasculari, cu prezenta de numar mare de vase.

EGFR pe biopsiile vaginale din lotul de lucru a aratat pozitivitate doar la nivel vascular pe 17 biopsii (73,9%), cu prezenta de numar crescut de vase, iar pe 6 biopsii reactia a fost negativa.

Actina muschiului neted pe biopsiile vaginale din lotul de lucru a aratat pozitivitate la nivel vascular pe 17 biopsii, vase cu calibru variabil (73,9%).

Oncoproteina P53 pe biopsiile vaginale din lotul de lucru a aratat pozitivitate, in toate cazurile, in rare celule epiteliale din stratul bazal.

Oncoproteina bcl2 pe biopsiile vaginale din lotul de lucru a prezentat reactie negativa.

Colagen IV pe biopsiile vaginale din lotul de lucru a aratat pozitivitate la nivel vascular si la nivelul membranei bazale a epiteliului scuamos pe 5 biopsii (8,9%).

MMP-2 pe biopsiile vaginale din lotul de lucru a aratat pozitivitate la nivel vascular si zonal la nivelul celulelor stromale si elementelor inflamatorii stromale pe 20 biopsii (86,95%); MMP-2 a fost mai bine exprimat la nivel vaginal la nivelul structurilor vasculare si la nivel stromal decat MMP-9.

MMP-9 pe biopsiile vaginale din lotul de lucru a aratat pozitivitate zonal, cu intensitate variabila, la nivelul celulelor stromale, elementelor inflamatorii stromale si in rare structuri vasculare pe 20 biopsii (86,95%).

Analiza ultrastructurala

Analiza ultrastructurala a evidenciat:

- prezenta de celulele epiteliale cubice si cilindrice, nuclei ovali dispusi bazal cu nucleol proeminent si contur regulat
- mitozele sunt rare
- unele celule epiteliale prezinta pe suprafata apicala microvili
- celulele epiteliale prezinta reticul endoplasmic bine dezvoltat, aparat Golgi situat in partea apicala a celulei
- celulele epiteliale prezinta mitocondrii raspandite in citoplasma
- unele celule epiteliale au nuclei cu o densitate mai mare a cromatinei nucleare
- unele celule epiteliale prezinta vacuole bazale

- stroma este axiala cu celule alungite cu nucleii ovali (unii sunt densi, picnotici, alții ușor mariți), cu nucleoli și membrana netedă sau ușor ondulată
- în citoplasma celulelor stromale se observă mitocondrii (unele cu cristă lungi), rețicul endoplasmic rugos (în unele celule bine dezvoltat), aparat Golgi, lizozomi, lipide și corpi veziculari.

Studiul fenomenului apoptotic

Pentru identificarea fenomenului apoptotic pe cazurile din lotul de studiu și din loturile martor criteriile morfologice urmărite au fost:

- condensarea cromatiniană și a citoplasmei
- prezența fragmentelor de citoplasmă care conțin cromatină condensată Examinarea s-a efectuat pe cazurile selecționate pre- și postterapie substitutivă hormonală.

Postterapie:

- biopsiile cu aspecte histologice de endometru cu aspecte combinate de proliferativ și slab secretor au prezentat în 1-2% din celule modificări apoptotice
- biopsiile cu aspecte histologice de endometru atrofic au prezentat < 1% din celule modificări apoptotice
- biopsiile cu aspecte histologice de endometru cu aspecte combinate de proliferativ și hiperplazic au prezentat în 2% din celule modificări apoptotice

Prin efectuarea testelor de biologie moleculară (hibridizarea in situ prin reacția TUNEL - terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling- marcarea enzimatică in situ a fragmentării ADN indusă prin apoptoză) pe cazurile selecționate (30 biopsii endometriale) s-a observat:

- Pozitivitate nucleară în **1-3%** din biopsiile endometriale recoltate **preterapie**
- Pozitivitate nucleară în **1-2%** din biopsiile endometriale recoltate **postterapie**

Analiza statistica a cazurilor studiate

Analiza statistică a parametrilor obținuți din studiul biopsiilor vaginale:

La analiza statistică a biopsiilor vaginale privind epiteliul mucoasei vaginale s-a observat o corelație strânsă, invers proporțională, statistic semnificativă între cazurile cu TSH și loturile martor ($r=-0,8$; $p=0,04$) pe 23 biopsii. Din analiza statistică rezultă că la 6 luni de la începerea TSH aspectul epiteliului pe biopsiile vaginale din lotul de lucru este ușor modificat față de aspectul epiteliului din loturile martor.

La analiza statistică a biopsiilor vaginale privind stroma mucoasei vaginale s-a observat o corelație direct proporțională, semnificativă din punct de vedere statistic între biopsiile recoltate de la pacientele cu TSH și cele din loturile martor ($r=0,41$; $p=0,04$) pe 23 biopsii. Din analiza statistică

rezulta ca la 6 luni de la inceperea TSH aspectul stromei pe biopsiile vaginale din lotul de lucru este usor modificat fata de aspectul stromei din loturile martor.

La analiza statistica a biopsiilor vaginale privind vascularizatia mucoasei vaginale s-a observat ca rezultatele obtinute nu se coreleaza statistic iar parametrii evolueaza independent; exista o diferenta semnificativa statistic intre TSH si loturi martor

($t_{Stat}=5,34$; $t_{critical}=2,07$; $p<0,001$) pe 23 biopsii. Din analiza statistica rezulta ca la 6 luni de la inceperea TSH aspectul vascularizatiei pe biopsiile vaginale din lotul de lucru este semnificativ modificat fata de aspectul epiteliului din loturile martor.

Analiza statistica a parametrilor obtinuti din studiul biopsiilor endometriale:

La analiza statistica a parametrilor obtinuti din studiul biopsiilor endometriale privind aspectele histopatologice ale mucoasei endometriale s-a observat o corelatie direct proportionala, dar nesemnificativa statistic intre aspectele histopatologice ale endometrului preterapie si sub TSH ($r=0,5$; $p=0,1$) pe 59 biopsii. Din analiza statistica rezulta ca la 6 luni de la inceperea TSH pe biopsiile endometriale din lotul de lucru aspectele histopatologice sunt semnificativ modificate fata de aspectele histopatologice din lotul preterapie, dar din punct de vedere statistic rezultatele nu sunt reproductibile.

La analiza statistica a parametrilor obtinuti din studiul biopsiilor endometriale privind expresia ER la nivelul epiteliului glandular preterapie si sub TSH (la 6 luni) s-a observat o diferenta semnificativa statistic (o diferenta de 5 ori mai mare

$t_{Stat}=10,95$; $t_{Critical}=2$). Din analiza statistica rezulta ca la 6 luni de la inceperea TSH pe biopsiile endometriale din lotul de lucru expresia ER la nivel epitelial glandular este semnificativ modificata fata de expresia ER din lotul preterapie.

Din analiza statistica: a expresiei ER in stroma endometrială (preterapie si sub TSH la 6 luni), a expresiei PGR la nivelul epiteliului glandular (preterapie si sub TSH la 6 luni) si a expresiei ER preterapie intre epiteliul glandular si stroma, nu s-a observat o corelatie semnificativa din punct de vedere statistic; ca urmare acesti parametri evolueaza independent.

La analiza statistica a parametrilor obtinuti din studiul biopsiilor endometriale privind expresia ER la nivelul epiteliului glandular si in stroma sub TSH (la 6 luni) s-a observat o usoara corelatie direct proportionala, semnificativa din punct de vedere statistic ($r=0,35$; $p=0,02$) pe 56 biopsii. Din analiza statistica rezulta ca la 6 luni de la inceperea TSH pe biopsiile endometriale din lotul de lucru expresia ER (cresterea) la nivel epitelial glandular se coreleaza cu expresia ER (cresterea) la nivel stromal.

La analiza statistica a parametrilor obtinuti din studiul biopsiilor endometriale privind expresia PGR la nivelul epiteliului glandular si in stroma sub TSH (la 6 luni) s-a observat o corelatia

stransa direct proportionala, semnificativa din punct de vedere statistic ($r=0,86$; $p<0,001$) pe 55 biopsii. Din analiza statistica rezulta ca la 6 luni de la inceperea TSH pe biopsiile endometriale din lotul de lucru expresia PGR (cresterea) la nivel epitelial glandular se coreleaza cu expresia PGR (cresterea) la nivel stromal.

La analiza statistica a parametrilor obtinuti din studiul biopsiilor endometriale privind expresia PGR la nivelul epiteliului glandular si in stroma preterapie s-a observat o corelatie stransa direct proportionala, semnificativa din punct de vedere statistic ($r=0,87$; $p=<0,001$) pe 55 cazuri studiate. Din analiza statistica rezulta preterapie pe biopsiile endometriale din lotul de lucru expresia PGR la nivel epitelial glandular se coreleaza cu expresia PGR la nivel stromal.

Concluzii finale :

1. Biopsiile endometriale si din mucoasa vaginala recoltate la pacientele cu TSH nu prezinta modificari neoplazice
2. Evaluarea citologica a frotiurilor cervico-vaginale recoltate la pacientele cu TSH arata o predominenta a frotiurilor CII
3. Sub TSH ,pe o perioada mai mare de 6 luni, la nivel endometrial predomina aspectele de endometru cu proliferare normala/slab proliferativ
4. Pe unele biopsii endometriale sau observat aspecte deciduiforme ale corionului (sugestive pentru efectele progesteronului din preparatele folosite)
5. La nivel vaginal sub TSH dispare atrofia vaginala cu cresterea numarului de straturi de celule la nivel epitelial
6. Sub TSH creste numarul de vase (angiogeneza) atat la nivel endometrial cat si la nivel vaginal, in unele cazuri cu prezenta de sufuziuni sangvine
7. Evaluarea terapiei substitutive hormonale trebuie sa cuprinda atat examinare citologica cat si examen histopatologic pentru acuratetea diagnosticului.
8. La nivelul mucoasei endometriale sub TSH creste numarul de ER si PGR la nivel epitelial si stromal, dar cu predominenta acestora la nivel epitelial glandular
9. La nivelul mucoasei vaginale sub TSH cresc numarul de ER si PGR ; ER se exprima doar la nivel epitelial iar PGR atat la nivel epitelial cat si stromal
10. Variatii in expresia receptorilor hormonali sub TSH apar datorita nivelelor plasmatiche de estradiol si datorita hetrogenitatii expresiei acestora
11. Pentru evidentiarea procesului de angiogeneza: la nivel endometrial s-au exprimat mai bine ACT si EGFR iar la nivel vaginal s-a exprimat mai bine FVIII
12. La nivelul mucoasei endometriale sub TSH oncoproteina bcl2 prezinta pozitivitate zonal, la nivel epitelial, ; sugestiv pentru apoptoza redusa si pentru efectele terapeutice ale progesteronului
13. La nivel endometrial si vaginal reactia pozitiva la Oncoproteina p53 nu s-a corelat cu o transformare neoplazica ; reprezinta expresia unei proteine nefunctionale (sau expresia variantei « salbatice » a p53)
14. La nivel endometrial sub TSH reactia la MMP-9 este mai intensa si se observa intr-un numar mai mare de celule decat reactia la MMP-2; sugestiv pentru influentarea reactiei MMP-9 de catre TSH (MMP-9 este sub controlul hormonilor steroizi si se exprima intr-un mod particular la nivel endometrial) cu remodelarea matricei extracelulare fara afectarea importanta a apoptozei

15. La nivel vaginal sub TSH reactia la MMP-2 este mai intensa si se observa intr-un numar mai mare de celule decat reactia la MMP-9; sugestiv pentru implicarea MMP-2 in metabolismul colagenului si in procesul de angiogeneza
16. Aspectele ultrastructurale ale biopsiilor endometriale sub TSH sunt compatibile cu prezenta de celule active, unele cu activitate secretorie
17. Aspectele ultrastructurale sunt in concordanta cu aspectele histopatologice si cu datele din literatura de specialitate
18. La nivel endometrial sub TSH rata apoptotică redusă (1-2%) observată morfologic este confirmată prin tehnica de hibridizare in situ (TUNEL)
19. Majoritatea parametrilor investigati in cadrul analizei statistice se coreleaza si sunt semnificativi din punct de vedere statistic
20. Schemele terapeutice din cadrul TSH trebuie sa fie ajustate functie de profilul hormonal, de evaluarea morfopatologica si de necesitatile fiecarei paciente
21. Schemele terapeutice diverse utilizate in cadrul TSH au condus la variate aspecte histopatologice si imunohistochimice
22. Aparitia de noi preparate farmacologice si tinte terapeutice, in cadrul TSH, necesita studii aprofundate asupra mucoasei endometriale si vaginale, pe o cazuistica extinsa