MAURI JOSÉ PIAZZA

AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DE RECEPTORES HORMONAIS DE ESTROGÊNIO, POR MÉTODO IMUNOCITOQUÍMICO, EM BIÓPSIAS DA MUCOSA VAGINAL DE MULHERES NO MENACME.

CORRELAÇÃO COM A IDADE, COM OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE (LH), FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH), PROLACTINA (PR), ESTRADIOL (E2) E COM OS ÍNDICES DE MATURAÇÃO DA CITOLOGIA ESFOLIATIVA VAGINAL.

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Paraná para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ivo Carlos Arnt

CURITIBA
1993

MAURI JOSÉ PIAZZA

AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DE RECEPTORES HORMONAIS DE ESTROGÊNIO, POR MÉTODO IMUNOCITOQUÍMICO, EM BIÓPSIAS DA MUCOSA VAGINAL DE MULHERES NO MENACME.

CORRELAÇÃO COM A IDADE, COM OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE (LH), FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH), PROLACTINA (PR), ESTRADIOL (E2) E COM OS ÍNDICES DE MATURAÇÃO DA CITOLOGIA ESFOLIATIVA VAGINAL.

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Paraná para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ivo Carlos Arnt

CURITIBA
1993

O futuro nos reserva muitas surpresas,
pois a ciência caminha sem tréguas nem repouso,
porque visa o infinito, e, como ele, é e será infinita.

José Medina

Dedico esta tese à minha esposa **Leonor**
e aos meus filhos **José Antônio** *e* **Ana Luiza**,
pela compreensão e estímulo de todos os momentos.

Dedico também aos meus queridos e
saudosos pais **José** *e* **Angélica**,
bem como às minhas queridas **irmãs**,
pelo estímulo às lides universitárias.

PROÊMIO

Presto uma saudosa lembrança a dois Professores que foram os meus iniciadores e Mestres nas lides universitárias.

Ao Professor **Francisco Victor Rodrigues** que me acolheu, para a realização do Curso de Pós-Graduação em Ginecologia no Instituto de Ginecologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Foi um humanista invejável, preocupado com a paz, a liberdade e a felicidade. Professor exemplar, pioneiro na formação de especialistas e possuidor de didática impecável.

Profissional participante, pregou a unidade da Tocoginecologia e lutou pela ética e pela dignidade da profissão. Ausente há vinte e um anos, procuro sempre evocar seus exemplos.

Com gratidão e saudade quero também recordar **Jean Claude Nahoum.** Obstetra e ginecologista, filósofo e psicólogo, mestre e aluno, escritor e leitor, líder e operário, contestador e orientador, inteligente e participante, exigente e honesto, algumas, entre muitas outras qualificações que possuía. Como professor e amigo teve grande influência em meu interesse pela endocrinologia ginecológica.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor **Ivo Carlos Arnt**. Sua disposição, em todos os momentos, foi de grande valia e sua crítica construtiva, de valor excepcional. Sua metodologia e conselhos freqüentes me propiciaram condições de melhor elaborar este trabalho.

Aos Professores **Giovani Lodo** e **Affonso Coelho** do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo grande apoio técnico e científico.

A **Marcos César Alves**, técnico de laboratório, e aos demais funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, que possibilitaram os exames histológicos e citológicos necessários para a realização desta tese.

Ao Professor **Oswaldo Malafaia**, Coordenador do Curso de Mestrado do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade oferecida em seu Departamento aos docentes do Departamento de Tocoginecologia para a realização deste curso.

Ao Professor **Paulo Afonso Bracarense Costa** do Departamento de Estatística do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná, pela análise estatística realizada e por seus conselhos e ensinamentos nessa área.

Aos **colegas do Departamento de Tocoginecologia da Universidade Federal do Paraná**, especialmente ao Professor **Francisco da Silva Furtado**, Chefe do Departamento, ao ao Professor **Arcélio Carneiro Teixeira**, responsável pela Disciplina de Ginecologia, sempre

presentes quando necessitei de apoio e compreensão durante a elaboração deste estudo, bem como aos **médicos residentes**, **enfermeiras** e **funcionários** deste Departamento.

Ao Dr. **Renato José Ramos** do Laboratório de Medicina Nuclear do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio na determinação das dosagens hormonais e pelo apoio especializado.

Aos **Diretores do Hospital de Clínicas** da Universidade Federal do Paraná, especialmente ao Professor **Osmar Martins**, pelo incremento às pesquisas dentro dessa instituição.

Ao meu querido filho **José Antônio**, à secretária **Elizabeth Oliva**, do Departamento de Tocoginecologia, e à **Izabel Cristina Guareschi Müller**, que procederam todo o trabalho de datilografia e de informatização, sem o qual seria extremamente difícil a conclusão desta tese.

A elaboração de um trabalho científico é uma tarefa coletiva, pois exige a presença e a dedicação de uma equipe. A todos que colaboraram direta ou indiretamente na realização das diferentes etapas desta pesquisa e na elaboração desta tese, meu profundo reconhecimento e perene gratidão.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS ix
LISTA DE FIGURAS x
LISTA DE TABELAS xii
LISTA DE ANEXOS xiv
RESUMO xv
SUMMARY xvi
OBJETIVOS xvii

INTRODUÇÃO 1

REVISÃO DA LITERATURA 7

1 RECEPTORES DE ESTROGÊNIO 8

2 RECEPTORES DE ESTROGÊNIO ESTUDADOS EM TECIDOS DE ORIGEM ANIMAL 9

3 RECEPTORES DE ESTROGÊNIO ESTUDADOS EM MULHERES 11
3.1 ENDOMÉTRIO 11
3.2 COLO E CORPO UTERINO 14
3.3 VAGINA 15
3.4 VULVA 17
3.5 OVÁRIOS 17
3.6 MAMAS 18
3.7 OUTRAS LOCALIZAÇÕES DOS RE EM SERES DO SEXO FEMININO 19

MATERIAL E MÉTODOS 20

1 SELEÇÃO DE PACIENTES 21

2 COLETA DE MATERIAL 24

3 TÉCNICAS DE LABORATÓRIO REALIZADAS NO ESTUDO 25
3.1 CITOLOGIA VAGINAL 25
3.2 DOSAGENS HORMONAIS 25
3.3 RECEPTORES HORMONAIS DE ESTROGÊNIO 26

4 METODOLOGIA ESTATÍSTICA 29

RESULTADOS 31

1 ASPECTOS GERAIS 32

2 PERFIL ENDÓCRINO 33
2.1 HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) 33
2.2 HORMÔNIO LUTEINIZANTE (LH) 35
2.3 PROLACTINA (PR) 36
2.4 ESTRADIOL (E2) 37

3 CITOLOGIA VAGINAL HORMONAL 39

4 RECEPTORES HORMONAIS CITOPLASMÁTICOS PARA O ESTROGÊNIO (REc) .. 41
4.1 REc NAS CÉLULAS DA CAMADA PROFUNDA DO EPITÉLIO VAGINAL 41
4.2 REc NAS CÉLULAS DA CAMADA INTERMEDIÁRIA DO EPITÉLIO VAGINAL 45
4.3 REc NAS CÉLULAS DA CAMADA SUPERFICIAL DO EPITÉLIO VAGINAL 48
4.4 AVALIAÇÃO DOS RE CITOPLASMÁTICOS NAS TRÊS CAMADAS DO EPITÉLIO VAGINAL EM DIFERENTES GRUPOS ETÁRIOS 52

5 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DOS REc COM OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS HORMÔNIOS FSH, LH, PR E E2 56

6 CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DOS RE CITOPLASMÁTICOS NAS DIFERENTES CAMADAS DO EPITÉLIO VAGINAL E OS ÍNDICES DE MATURAÇÃO DA CITOLOGIA ESFOLIATIVA VAGINAL 69
6.1 CAMADA PROFUNDA 70
6.2 CAMADA INTERMEDIÁRIA 71
6.3 CAMADA SUPERFICIAL 72

DISCUSSÃO 73

CONCLUSÕES 81

ANEXOS 85

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 94

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CP - Camada profunda do epitélio vaginal

CI - Camada intermediária do epitélio vaginal

CS - Camada superficial do epitélio vaginal

E1 - Estrona

E2 - Estradiol

E3 - Estriol

FSH - Hormônio folículo estimulante

HPV - *Human papiloma virus*

kDa - Coeficiente de dissociação (kilodaltons)

IM - Índice de maturação da mucosa vaginal

LH - Hormônio luteinizante

LH-RH - Fator liberador de LH e de FSH

ng - nanograma 10^{-9} g

PAP - Peroxidase e antiperoxidase

pg - picograma 10^{-12} g

PR - Prolactina

RE - Receptor de estrogênio

REc - Receptor de estrogênio citoplasmático

RNAm - Ácido ribonucleico mensageiro

RPg - Receptor de progesterona

RPg c - Receptor de progesterona citoplasmático

REn - Receptor estrogênico nuclear

SRE - *Steroid response element*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MECANISMO DE AÇÃO CELULAR À RESPOSTA DOS ESTROGÊNIOS 06

FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO DO FSH NAS DUAS FASES DO CICLO MENSTRUAL 34

FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DO LH NAS DUAS FASES DO CICLO MENSTRUAL 36

FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DA PROLACTINA NAS DUAS FASES DO CICLO MENSTRUAL 37

FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO DO ESTRADIOL NAS DUAS FASES DO CICLO MENSTRUAL 38

FIGURA 6 - CORTE HISTOLÓGICO DA MUCOSA VAGINAL. Caso nº. 48 42

FIGURA 7 - CORTE HISTOLÓGICO DA MUCOSA VAGINAL. Caso nº. 19 43

FIGURA 8 - INTENSIDADE DOS REc NAS CAMADAS PROFUNDA, INTERMEDIÁRIA E SUPERFICIAL NAS DUAS FASES DO CICLO MENSTRUAL 44

FIGURA 9 - CORTE HISTOLÓGICO DA CAMADA INTERMEDIÁRIA DA MUCOSA VAGINAL 46

FIGURA 10 - DETALHE DE UM CORTE HISTOLÓGICO DA CAMADA INTERMEDIÁRIA DO EPITÉLIO VAGINAL 47

FIGURA 11 - CORTE HISTOLÓGICO DO EPITÉLIO VAGINAL SUBMETIDO A TRATAMENTO IMUNOCITOQUÍMICO 49

FIGURA 12 - CORTE HISTOLÓGICO DA BIÓPSIA DE MUCOSA DO EPITÉLIO VAGINAL SUBMETIDO A TESTE IMUNOCITOQUÍMICO 49

FIGURA 13 - INTENSIDADE DOS REc NAS CAMADAS PROFUNDA, INTERMEDIÁRIA E SUPERFICIAL EM DIFERENTES GRUPOS ETÁRIOS 53

FIGURA 14 - INTENSIDADE DOS REc DAS CÉLULAS DO EPITÉLIO VAGINAL EM DOIS SUBGRUPOS ETÁRIOS - I E II (EXTREMOS DA VIDA REPRODUTIVA) 55

FIGURA 15 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA PROFUNDA DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DO FSH PLASMÁTICO .. 57

FIGURA 16 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA INTERMEDIÁRIA DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DO FSH PLASMÁTICO 58

FIGURA 17 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA SUPERFICIAL DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DO FSH PLASMÁTICO 59

FIGURA 18 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA PROFUNDA DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DO LH PLASMÁTICO ... 60

FIGURA 19 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA INTERMEDIÁRIA DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DO LH PLASMÁTICO 61

FIGURA 20 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA SUPERFICIAL DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DO LH PLASMÁTICO 62

FIGURA 21 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA PROFUNDA DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DA PR PLASMÁTICO ... 63

FIGURA 22 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA INTERMEDIÁRIA DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DA PR PLASMÁTICO 64

FIGURA 23 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA SUPERFICIAL DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DA PR PLASMÁTICO 65

FIGURA 24 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA PROFUNDA DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DO E2 PLASMÁTICO ... 66

FIGURA 25 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA INTERMEDIÁRIA DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DO E2 PLASMÁTICO 67

FIGURA 26 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA SUPERFICIAL DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DO E2 PLASMÁTICO 68

LISTA DE TABELAS

TABELA I - GRUPO A - CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GRUPO DE MULHERES COM IDADE ENTRE 11 E 25 ANOS 22

TABELA II - GRUPO B - CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GRUPO DE MULHERES COM IDADE ENTRE 26 E 45 ANOS 23

TABELA III - ANÁLISE DOS DIVERSOS GRUPOS ETÁRIOS - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS POR IDADE 32

TABELA IV - FASES DO CICLO MENSTRUAL DE 49 PACIENTES - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS 33

TABELA V - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS DOSAGENS PLASMÁTICAS DE FSH - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS 34

TABELA VI - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS DOSAGENS PLASMÁTICAS DE LH - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS 35

TABELA VII - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS DOSAGENS PLASMÁTICAS DE PROLACTINA - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS 36

TABELA VIII - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS DOSAGENS PLASMÁTICAS DE ESTRADIOL - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS 38

TABELA IX - CITOLOGIA VAGINAL HORMONAL - ÍNDICE DE MATURAÇÃO (IM) - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS 39

TABELA X - CORRELAÇÃO DOS ÍNDICES DE MATURAÇÃO (IM) DA CITOLOGIA VAGINAL COM AS FASES DO CICLO MENSTRUAL 40

TABELA XI - TABULAÇÃO CRUZADA ENTRE A IDADE DAS PACIENTES E OS ÍNDICES DE MATURAÇÃO (IM) DA CITOLOGIA VAGINAL 41

TABELA XII - AVALIAÇÃO DOS REc NA CAMADA PROFUNDA DO EPITÉLIO VAGINAL - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS 42

TABELA XIII - AVALIAÇÃO DOS REc A CAMADA INTERMEDIÁRIA DO EPITÉLIO DA VAGINA - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS 45

TABELA XIV - DISTRIBUIÇÃO DA INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA SUPERFICIAL DA MUCOSA VAGINAL - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS 48

TABELA XV - TABULAÇÃO CRUZADA CORRELACIONANDO OS NÍVEIS DE INTENSIDADE DOS REc NAS CAMADAS PROFUNDA E SUPERFICIAL DO EPITÉLIO VAGINAL 50

TABELA XVI - TABULAÇÃO CRUZADA CORRELACIONANDO A INTENSIDADE DOS REc NAS CAMADAS INTERMEDIÁRIA E SUPERFICIAL DO EPITÉLIO DA VAGINA 51

TABELA XVII - TABULAÇÃO CRUZADA CORRELACIONANDO A INTENSIDADE DOS REc NAS CAMADAS INTERMEDIÁRIA E PROFUNDA DO EPITÉLIO VAGINAL 52

TABELA XVIII - CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA PROFUNDA DO EPITÉLIO VAGINAL E OS ÍNDICES DE MATURAÇÃO (IM) DA CITOLOGIA ESFOLIATIVA VAGINAL 70

TABELA XIX - CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA INTERMEDIÁRIA DO EPITÉLIO VAGINAL E OS ÍNDICES DE MATURAÇÃO (IM) DA CITOLOGIA ESFOLIATIVA VAGINAL 71

TABELA XX - CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA SUPERFICIAL DO EPITÉLIO VAGINAL E OS ÍNDICES DE MATURAÇÃO (IM) DA CITOLOGIA ESFOLIATIVA VAGINAL 72

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I - INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA PROFUNDA DO EPITÉLIO VAGINAL CORRELACIONADAS COM AS FASES DO CICLO MENSTRUAL 86

ANEXO II - CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA INTERMEDIÁRIA DO EPITÉLIO VAGINAL E AS FASES DO CICLO MENSTRUAL .. 87

ANEXO III - CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA SUPERFICIAL DO EPITÉLIO DA VAGINA COM AS FASES DO CICLO MENSTRUAL 88

ANEXO IV - INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA PROFUNDA DO EPITÉLIO VAGINAL EM DIFERENTES GRUPOS ETÁRIOS 89

ANEXO V - INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA INTERMEDIÁRIA DO EPITÉLIO DA VAGINA EM DIFERENTES GRUPOS ETÁRIOS 90

ANEXO VI - INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA SUPERFICIAL DO EPITÉLIO VAGINAL EM DIFERENTES GRUPOS ETÁRIOS 91

ANEXO VII - INTENSIDADE DOS REc NOS SUBGRUPOS ETÁRIOS I E II - (EXTREMOS DA VIDA REPRODUTIVA) 92

ANEXO VIII - PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS 93

RESUMO

A presença e a intensidade dos receptores estrogênicos citoplasmáticos foram analisadas em biópsias da mucosa vaginal, realizadas em 49 mulheres no menacme, sem patologia clínica ou endócrina, atendidas no ambulatório da Clínica Ginecológica do Departamento de Tocoginecologia da UFPR para tratamento de procidências das paredes vaginais ou de prolapso genital. Os fragmentos de epitélio vaginal, coletados no terço médio das paredes laterais da vagina foram processados por método imunocitoquímico (PAP), para identificação e avaliação de proteínas imunorreativas específicas, no citoplasma. As diferentes colorações que os cortes histológicos apresentaram, após submetidos a imunorreações específicas, permitiram sugerir uma sistematização para interpretar e avaliar o grau de intensidade dos receptores de estrogênio do citoplasma. Considerando o aspecto das granulações citoplasmáticas convencionou-se que os REc apresentavam intensidade discreta (+) quando a coloração era amarelo-clara; moderada (++), quando a coloração era amarelada; forte (+++) quando a coloração era amarelo-alaranjada; acentuada (++++), quando a coloração era avermelhada e ausente (zero), quando os receptores estrogênicos não estavam presentes no citoplasma. Os receptores proteicos específicos ao estrogênio foram identificados no citoplasma das células que compõem as três camadas celulares do epitélio vaginal (CP - camada profunda, CI - camada intermediária e CS - camada superficial). A CI possui maior intensidade de REc. Em mulheres com citologia esfoliativa vaginal compatível com o perfil endócrino e adequada à faixa etária, a intensidade dos REc das células da CI não dependem das oscilações hormonais plasmáticas, nem da faixa etária. As pacientes muito jovens (idade entre 11 e 15 anos) tiveram menor incidência de REc nas células da camada intermediária do que as mulheres que cursam o período final da idade reprodutiva (idade entre 40 e 45 anos). A correlação entre a intensidade dos REc observados nas células das três camadas do epitélio vaginal de mulheres no menacme e os índices de maturação da citologia vaginal não resultaram em valores estatisticamente significativos. O epitélio vaginal das mulheres, um sensível efetor estrogênico, presta-se para a identificação e valorização dos REc, desde que sejam considerados cada um dos fatores endócrinos, as diferentes fases do ciclo biológico da mulher, a faixa etária e as diferentes estruturas celulares que o compõem.

SUMMARY

The presence and intensity of the estrogen-citoplasmatic receptors were analyzed in vaginal epithelium biopsies, conducted in 49 women undergoing normal sexual life, with no clinic diseases or endocrine one, assisted in the Tocogynecologics Department of the UFPR for treatment of vaginal or genital prolapsed. The fragments of vaginal epithelium, collected from the half-way of the vaginal tissue, were processed using imunocitochemical method (PAP), for identification and evaluation of immune-reactive specific proteins, on the cytoplasm. The different colors obtained from the histological cuts, after specific immune-reactions, allowed us to suggest a systematic way to understand the degrees of intensity of the estrogen receptors of the cytoplasm. Considering the looks of the citoplasmatic clusters, we classified the estrogen receptors as following: light intensity (+), when the color obtained was light yellow; moderate (++), when the color obtained was yellow; strong (+++), when the color obtained was yellow-orange; very strong (++++), when the color obtained was light red e absent (zero), when no receptors were present in the cytoplasm at all. The protein receptors specific to estrogen were identified in the cytoplasm of the cells that build the three cellular layers of the vaginal epithelium (deep layer, intermediate layer and superficial layer). The intermediate layers have the stronger intensity of estrogen receptors. In women with vaginal cytology compatible with the endocrine standard the proper age, the intensity of the estrogen receptors of the intermediate layer cells shouldn't depend on the hormonal plasmatic fluctuations, neither on the age. The too young patients (age among 11 and 15 years old), had lesser presence of estrogen receptors in cells of the intermediate layer than the women who were undergoing the latter period of reproductive life (age among 40 and 45 years old). The relation between the intensity of estrogen receptors observed in the cells of the three layers of the vaginal epithelium of these women and the MI (maturation index) rates of the vaginal cytology did not result in statistically significant values. The vaginal epithelium of these women is a proper environment for the identification and qualification of the estrogen receptors, since that are considered each one of the endocrine factors, the different stages of the biological cycle of the woman, the age and the different cellular structures that build it.

OBJETIVOS

1 Determinar a presença de RE citoplasmáticos em fragmentos de tecido extraídos da mucosa vaginal de mulheres no menacme.

2 Avaliar as variações da intensidade dos RE citoplasmáticos em frações do epitélio vaginal, nas duas fases do ciclo menstrual.

3 Correlacionar os níveis da intensidade dos RE citoplasmáticos nos fragmentos de tecido vaginal com os valores de FSH, LH, PR e E2 plasmáticos.

4 Analisar a correlação entre os índices de maturação da citologia esfoliativa vaginal com a intensidade dos RE citoplasmáticos presentes nas células da mucosa vaginal.

5 Analisar as diferenças dos níveis de intensidade dos RE citoplasmáticos encontrados em biópsias do epitélio vaginal de um grupo de mulheres jovens e de outro grupo de mulheres em fase final do período reprodutivo.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A estrutura e a complexidade do aparelho genital feminino deve-se à diversidade de suas funções. À medida que a filogenia torna-se mais complexa, a ontogênese amplia e aumenta suas exigências. A esta exigência máxima da ontogênese humana corresponde a mais completa e aperfeiçoada estrutura e fisiologia dos órgãos genitais da mulher.

Sob o comando dos mecanismos neuroendócrinos e psíquicos, o aparelho genital feminino sofre alterações periódicas, cíclicas.

A vagina, especialmente seu epitélio, segue um verdadeiro ciclo histológico com variações mensais típicas e outras alterações específicas a cada uma das etapas biológicas que a mulher percorre durante sua vida. Sua mucosa, revestida por epitélio poliestratificado de tipo pavimentoso, está sujeita à ação dos hormônios, sobretudo dos estrogênios, os quais interferem no mecanismo de regulação do glicogênio existente nas células vaginais. A presença do glicogênio, na luz vaginal, oriundo das células de descamação, é utilizado pela flora vaginal para produzir fermentação láctea e acidificação do meio vaginal. O meio ácido constitui-se num dos mecanismos de defesa a infecções genitais. A vagina, além de ser um órgão copulador, cumpre também o papel de depurador e protetor do aparelho genital feminino. O trofismo da mucosa vaginal depende dos estímulos estrogênicos. Sua manutenção é de extrema importância na preservação de suas condições funcionais, quer na função protetora contra agentes agressores infecciosos ou traumáticos, quer na adequada resposta aos estímulos sexuais.

Pode-se descobrir um verdadeiro ciclo histológico vaginal, cuja existência está confirmada pelas modificações citológicas do material que se desagrega do epitélio vaginal. A

citologia esfoliativa vaginal é universalmente reconhecida como um procedimento eficaz para a investigação das variações do perfil hormonal que afetam a mulher.

A partir da puberdade, as camadas intermediária e superficial do epitélio vaginal experimentam um considerável desenvolvimento. Uma vez instalados os ciclos menstruais, comprovam-se as variações periódicas no epitélio vaginal. Na fase folicular do ciclo, existe uma proliferação importante estimulada pelo aumento dos níveis dos estrogênios circulantes. Na fase progestacional, diminui a espessura do epitélio, ocorrendo intensa desagregação deste. Quando se instala a menopausa, o epitélio vaginal experimenta um processo de involução progressiva, até a atrofia, em conseqüência das variações hormonais.

A ação dos estrogênios sobre a mucosa vaginal humana pode ser avaliada pela citologia das células vaginais que se desagregam. A ação do estrogênio depende da ocorrência de receptores protéicos específicos.

A intensidade com que os receptores hormonais específicos aparecem nas células da mucosa vaginal em um grupo de mulheres no menacme é o objetivo desta pesquisa. A investigação dos receptores hormonais estrogênicos nas células do epitélio vaginal, colhidos em diferentes fases do ciclo vaginal e correlacionados com as dosagens plasmáticas do FSH, LH, PR e E2, faz parte do protocolo experimental. O experimento ainda analisa o significado estatístico da correlação dos índices de maturidade da citologia esfoliativa vaginal, com os níveis de intensidade de receptores estrogênicos encontrados em biópsias da mucosa vaginal.

Quando BEATSON (1896) admitiu a interdependência hormonal das mamas com os ovários e, posteriormente, quando GLASCOK e HOEKSTRA (1959), FOLCA et al. (1961) e TOFT e GORSKI (1966) evidenciaram a dependência hormonal de alguns tumores, passou-se a suspeitar que os estrogênios fixavam-se a receptores tumorais, iniciando-se, deste modo, as investigações sobre os receptores específicos sensíveis a diferentes secreções endócrinas.

Seguindo o modelo proposto por JENSEN et al. (1969), a penetração do hormônio estrogênico parece seguir um processo de duas fases:

a) a primeira fase ocorre no citoplasma;

b) a segunda fase ocorre no núcleo.

O estrogênio atravessa a membrana celular por difusão passiva e penetra no citoplasma, onde interage com um receptor solúvel, formando um complexo não ativo. O receptor citoplasmático é constituído de uma unidade ligante (8S) e um proteína de 90 kDa (proteína *Heat-Shock*), a qual é específica para a ligação do estrogênio. Após a associação do estrogênio à unidade ligante, o complexo,agora ativo, é transportado para o núcleo, onde vai se ligar a seqüências específicas de DNA. Estas seqüências são denominadas elementos de resposta ao esteróide (*steroid response elements* - SRE) e têm a característica de ampliar a transcrição do código genético, conforme MUNCK et al. **citados** por COOKE et al. (1988). A combinação do esteróide com seu receptor, para formar o complexo de ligação no DNA, é capaz de regular a atividade gênica. O maior determinante da especificidade do estrogênio é a especificidade do ligante do receptor, que é determinada pela disponibilidade de SREs no DNA, as quais influenciam a eficiência da iniciação do RNAm, evidenciado por MULLER e RENKAWITZ **citados** por COOKE et al. (1988). A especificidade e a afinidade às proteínas receptoras permitem que os receptores estrogênicos sejam determinados através de métodos imunocitoquímicos e de hibridização *in situ*.

A identificação dos RE no citoplasma e núcleo das células teciduais do aparelho genital feminino e sua quantificação passaram a ter importância nas avaliações dos perfis estrogênicos, já que estas proteínas específicas interferem no metabolismo celular dos tecidos hormônio-dependentes. A teoria sobre os mecanismos de ação dos RE adquire importância maior durante o uso de terapêutica hormonal em patologias malignas para o tratamento de tumores hormônio-dependentes, quer de mama, quer de endométrio, ou em neoplasias linfomatosas.

A identificação dos RE e sua quantificação permite avaliar o êxito da terapêutica hormonal e colabora para a avaliação do prognóstico.

As técnicas imunocitoquímicas influenciaram profundamente o desenvolvimento da endocrinologia e da neurobiologia nos últimos decênios.

As reações imunocitoquímicas são específicas e a especificidade depende da valorização dos fatores que influenciam o resultado final destas reações. Uma das condições para a

especificidade é a prova de que a substância em investigação no tecido, é realmente imunorreativa a um anti-soro puro específico, conforme determinaram POOL et al. (1982).

A presença de proteínas receptoras imunorreativas em células do epitélio vaginal de mulheres são pesquisadas neste experimento. A investigação imunocitoquímica visa demonstrar a presença de proteínas receptoras específicas, com afinidade ao estrogênio, em células das camadas profunda, intermediária e superficial de fragmentos de tecido da mucosa vaginal.

A avaliação dos níveis de intensidade com que os receptores de estrogênio são encontrados nas células vaginais em diferentes situações da vida biológica das mulheres, no menacme, permite melhor compreensão dos mecanismos e funções dos hormônios estrogênicos e torna mais fácil a interpretação dos fenômenos que determinam as alterações cíclicas, fisiológicas e citológicas da vagina e de seu epitélio de revestimento.

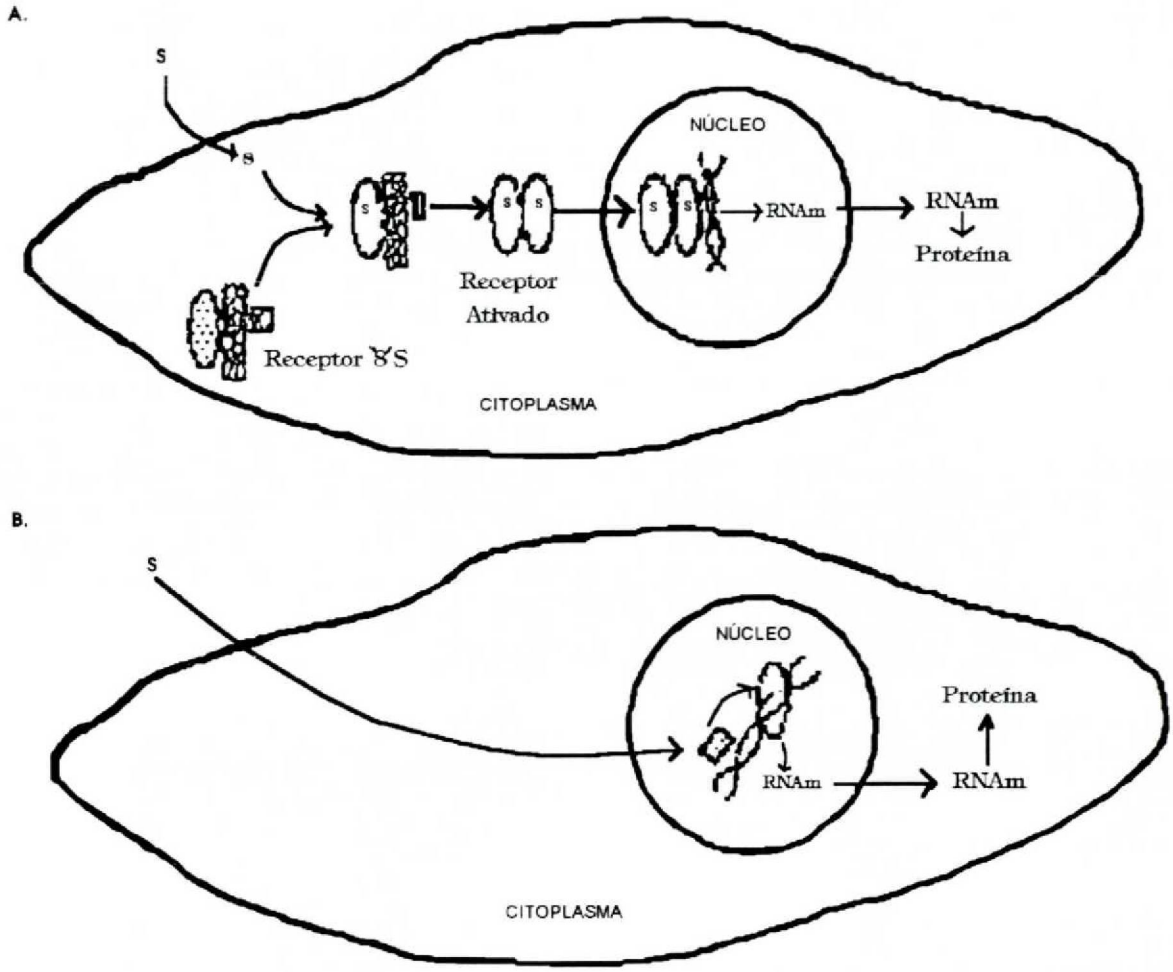


FIGURA 1 - MECANISMO DE AÇÃO CELULAR À RESPOSTA DOS ESTROGÊNIOS

FENÔMENOS INTRACELULARES MEDIADOS PELA AÇÃO DOS HORMÔNIOS ESTERÓIDES:

A. Modelo em que o receptor citoplasmático é transferido ao núcleo após unir-se ao esteróide (S). O receptor citoplasmático "8S" é formado por uma unidade ligante e outras unidades, entre as quais uma proteína do tipo *heat shock* de 90 kDa. Esta representação esquemática aplica-se aos receptores de estrogênios, mas não necessariamente a outras classes de receptores.

B. Modelo em que o receptor não ligante está no núcleo. Há mudanças no esteróide ligante (S), que pode induzir maiores seqüências de DNA.

(COOKE, B.A.; KING, R. J. B.; VAN DER MOLEN, H. J. **Hormones and their actions**. 1988).

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

1 RECEPTORES DE ESTROGÊNIO (RE) - ASPECTOS GERAIS

Em 1896, BEATSON (1896) admitiu existir nas células tumorais fatores de crescimento sensíveis às secreções endócrinas.

Decorreram décadas até que as pesquisas de JENSEN e JACOBSON (1962) evidenciassem os efeitos da ação direta dos hormônios estrogênicos sobre as células do útero de roedores. Posteriormente, KING e MAINWARING (1974) demonstraram a dependência hormonal de certos tumores e confirmaram a fixação dos estrogênios em receptores.

As investigações de MAURER e CHALKLEY (1967) e de TENG e HAMILTON (1969) permitiram identificar a existência de um complexo hormônio-receptor, a nível nuclear, com grande afinidade pela cromatina nuclear. A fixação do hormônio em um receptor dá-se por um processo acelerado, dependente da temperatura, explicaram os autores. Demonstraram que a fixação do homônio no receptor acha-se muito reduzida a 4^{o}C.

Os receptores hormonais citoplasmáticos são formados por proteínas muito instáveis, sendo específicas a cada tipo de hormônio, descreveram JENSEN et al. (1969). A concentração e a intensidade de sua freqüência nas células de determinados tecidos está diretamente correlacionada com as variações hormonais circulantes, evidenciaram FEHERTY et al. (1970).

A dependência hormonal característica de determinados tumores é regulada pela existência de receptores hormonais específicos, na opinião de KING et al. (1974).

As propriedades fisico-químicas da membrana celular das células de determinados tecidos facilitam o mecanismo pelo qual alguns hormônios, o estrogênio por exemplo, atingem o citoplasma. CHAN e O'MALLEY (1976; 1978) observaram que os estrogênios penetram pela membrana celular por difusão passiva, aproveitando as diferentes concentrações de proteínas nos espaços extra e intracelulares.

O aperfeiçoamento da investigação laboratorial e o aprimoramento tecnológico permitiram a PERTSCHUK (1976) e a PERTSCHUK et al. (1978) determinar a existência de receptores hormonais, utilizando a imunofluorescência em cortes histológicos. Com o advento de novos métodos de detecção dos receptores hormonais, a literatura enriqueceu-se com as contribuições de KURZON e STERNBERGER (1978), KING et al. (1982), WELSHONS et al. (1984) e PRESS et al. (1984; 1986).

2 RECEPTORES DE ESTROGÊNIO ESTUDADOS EM TECIDOS DE ORIGEM ANIMAL

Ensaios experimentais, utilizando animais de biotério, permitiram a BATRA et al. (1984) comprovar que diminui a intensidade dos RE em células da mucosa vaginal de coelhas ooforectomizadas e submetidas a tratamento com estradiol e estriol.

Os pesquisadores concluíram sua investigação, comprovando uma proliferação da mucosa vaginal após a administração de baixas doses de estrogênios por um período prolongado, com a diminuição da concentração dos RE.

Estudando as células epiteliais da mucosa vaginal de ratas imaturas e adultas, FRANCIS-DEAN et al. (1985) confirmaram a presença dos RE, quer no epitélio vaginal, quer no tecido muscular.

Nas células do revestimento epitelial da mucosa vaginal de fetos de porcas prenhes, as observações de NGUYEN et al. (1986) evidenciaram a existência dos RE e dos RPg. Os

mesmos autores notaram que os níveis de intensidade dos receptores hormonais decrescem logo após o nascimento, voltando a aumentar na segunda semana de vida.

GUPTA et al. (1986) correlacionaram as variações dos níveis circulantes de esteróides com as variações da intensidade dos RE encontrados no citoplasma e no núcleo das células da mucosa vaginal de ratas.

Observando cortes histológicos de fragmentos de tecidos biopsiados do aparelho reprodutor de macacas, MACLELLAN et al. (1984) identificaram os RE pela técnica de anticorpos monoclonais. Com técnica semelhante, ZAIRO et al. (1989) realizaram estudos comparativos dos níveis de RE e de RPg em células do útero de coelhas.

Receptores estrogênicos e de progesterona foram identificados em células endometriais de éguas por TONANELLI et al. (1991). Os resultados desta investigação mostraram níveis altos dos receptores na fase de estro e no período precoce do diestro. Nos primeiros meses de gestação destes animais observaram uma sensível redução dos RE. Para demonstrar a importância que os esteróides têm na regulação e na concentração dos receptores a nível do endométrio, os autores procederam a ooforectomia nas éguas. Após este ato cirúrgico, houve um aumento na quantidade dos receptores.

Analisando cortes histológicos de diversos tecidos do aparelho genital feminino de ratas recém-nascidas, YAMASHITA et al. (1989; 1990) chamaram a atenção para o progressivo aumento dos RE nas células do epitélio e do estroma dos fragmentos de tecido coletados no oviduto, útero, cérvice e vagina.

Para avaliar o comportamento dos receptores hormonais em células dos órgãos genitais de mulheres e de fêmeas de macacos, FLICKINGER et al. (1977) submeteram o grupo de macacas estudado a prévia castração, sendo a seguir administrado estrogênio e progesterona. Concluíram que a intensidade dos RE e dos RPg é afetada e sofre variações conforme as mudanças dos níveis hormonais circulantes. Resultado semelhante obtiveram KURZON e STERNBERGER (1978), estudando os receptores hormonais em amostras de tecido uterino.

Segundo MACLELLAN et al. (1984), os receptores estrogênicos e os RPg identificados em preparados histológicos de tecidos oriundos de órgãos genitais de primatas predominam em área nuclear.

VICINI et al. (1991) investigaram os RE em tecidos linfóides normais e em linfomas oriundos de amostras colhidas em cães.

Em 1992, HILD-PETITO et al. (1992), utilizando a imunocitoquímica encontraram RE e RPg em cortes histológicos do útero de macacas do gênero babuíno. Nas macacas prenhes, os RE estavam presentes no miométrio e nos tecidos que originam as arteríolas espiraladas.

3 RECEPTORES DE ESTROGÊNIO (RE) ESTUDADOS EM MULHERES

3.1 ENDOMÉTRIO

Em 1950, NOYES et al. (1950) admitiram que o endométrio localizado no fundo uterino é melhor efetor hormonal do que aquele do segmento inferior do útero, razão por que há predominância de RE nas células endometriais do fundo uterino.

Há presença dos RE no citoplasma (RE c) ou reunidos a nível nuclear (RE n). Em ambas localizações atuam como mediadores ou como aceleradores da resposta celular ao estímulo dos hormônios esteróides, como confirmaram as investigações de EVANS et al. (1974). Ao relacionar a intensidade dos RE com as fases do ciclo menstrual de mulheres hígidas, os autores evidenciaram que, na fase proliferativa, há maior riqueza de RE no tecido endometrial. Ao contrário, na fase secretora a pesquisa demonstrou decréscimo dos RE.

As conclusões do mesmo trabalho revelaram que, em mulheres com tumores endometriais bem diferenciados, os RE apresentaram maior intensidade, evidenciando sua dependência ao grau de diferenciação dos tecidos tumorais.

O endométrio, tecido altamente sensível às variações hormonais próprias das diferentes fases da vida de uma mulher, presta-se a investigação de RE, como demonstraram

MUECHLER et al. (1975). A presença de RE era mais intensa nos endométrios proliferativos e seus níveis decresciam sensivelmente no grupo etário de mulheres na pós-menopausa.

FLICKINGER et al. (1977), em experimentos realizados com cortes histológios de endométrio e com fragmentos de tubas extraídos de fêmeas de macacos e de mulheres, confirmaram a presença de maior quantidade de RE no tecido endometrial colhido na fase proliferativa. Analisando as biópsias dos segmentos tubários, encontraram intensidade maior de RE a nível ampolar, admitindo que tal fato deve-se às características do revestimento do endosalpinge, que na região ampolar é pobre em tecido muscular.

A distribuição de RE citoplasmático no revestimento endometrial varia conforme a região de coleta da amostra. TSIBRIS et al. (1978; 1981) encontraram predominância dos RE no endométrio da região fúndica do útero.

Pesquisando uma correlação entre os níveis dos receptores hormonais e os níveis hormonais plasmáticos circulantes, BAYARD et al. (1978) mostraram significativa elevação da presença dos RE no epitélio endometrial durante a fase proliferativa do ciclo menstrual e um sensível decréscimo durante a fase secretora. No mesmo experimento, notaram níveis maiores de RE nos núcleos das células endometriais de mulheres, na primeira fase do ciclo menstrual, enquanto que os RPg foram encontrados em maior intensidade no citoplasma. O inverso ocorreu na fase luteínica.

Mais tarde, NATRAJAN et al. (1981) avaliaram a presença dos RE e dos RPg em biópsias de endométrio de um grupo de mulheres submetidas a diferentes tratamentos hormonais. Concluíram que os níveis de RE nas pacientes tratadas com E2 não eram significativamente diferentes do grupo de mulheres normais e sem a medicação. Por sua vez a intensidade dos RPg crescia, sensivelmente, com o aumento dos estrogênios endógenos, ou, quando eram administrados estrogênios, ocorrendo um pico máximo na fase pré-ovulatória.

VAN HAAFTEN et al. (1982), em estudo realizado para determinar os RE e os RPg no endométrio, concluíram que os níveis dos RE eram menores na fase lútea, do que na fase proliferativa.

As análises imunocitoquímicas realizadas por PRESS et al. (1984), para observação dos RE em endométrio humano, confirmaram o trabalho anteriormente publicado por EVANS et al. (1974). Os resultados demonstraram que no período pós-ovulatório as células endometriais não apresentam RE.

PRESS et al. (1984, 1986), utilizando a técnica dos anticorpos monoclonais em tecido congelado, observaram a intensidade dos RE e dos RPg a nível do endométrio e de outros tecidos do aparelho genital. Seus resultados confirmaram uma queda significativa nos níveis dos receptores hormonais após a formação do corpo lúteo.

A presença de níveis mais elevados de RE no epitélio endometrial durante a fase proliferativa foi comprovada nas pesquisas de BAYARD et al. (1978) e de VOGLER et al. (1989).

LING (1989) correlacionou os níveis séricos de E2, Pg, FSH e LH com a intensidade de aparecimento dos receptores citosólicos específicos para os estrogênios e para progesterona, em um grupo de mulheres com insuficiência luteínica. Comparando os níveis de intensidade dos REc e dos RPgc destas mulheres com um grupo controle, constataram que a intensidade dos receptores hormonais específicos é menor nas pacientes com insuficiência luteínica.

SAVCHENKO et al. (1990) obtiveram resultados semelhantes e admitiram haver um desequilíbrio na formação dos RPg possivelmente induzido por um hipoestrogenismo prévio.

Em uma amostra de mulheres com hiperplasia endometrial, LINDAHL et al. (1991) investigaram a presença dos RE. Os receptores hormonais foram detectados com maior intensidade nas hiperplasias endometriais císticas.

Observações realizadas em cortes histológicos de tecido endometrial proliferativo e em amostras de fragmentos de adenocarcinoma de endométrio permitiram a SNIJDERS et al. (1992) concluírem que há uma redução progressiva dos RE e dos RPg à medida que progride a lesão maligna e as células tornam-se mais indiferenciadas.

3.2 COLO E CORPO UTERINO

SANBORN et al. (1975, 1978), estudando em células do colo uterino a presença de proteínas específicas que se ligam aos estrogênios, evidenciaram que os níveis de concentração dos RE eram 5 a 10 vezes menores nas células do colo uterino do que nos tecidos endometriais, porém não havia diferenças significativas, quando os resultados eram correlacionados com as fases do ciclo menstrual.

TSIBRIS et al. (1981) obtiveram resultados iguais e não comprovaram diferenças significativas dos níveis de RE nas células do colo do útero, em quaisquer das duas fases do ciclo menstrual. Sua pesquisa demonstrou maior concentração dos níveis dos RE no epitélio cilíndrico do colo uterino, do que nas células do epitélio poliestratificado.

Nas pesquisas de BRENTANI et al. (1985), a intensidade dos RE estudados em células do colo uterino não sofreu variação nas diferentes fases do ciclo menstrual de mulheres no menacme, nem no grupo de mulheres que ingeriam anticoncepcionais orais. Os mesmos autores, investigando a presença de receptores hormonais em cortes do tecido oriundo do colo uterino de mulheres na menopausa, observaram um aumento significativo dos RE e dos RPg.

Os RE foram também pesquisados por VAN HAAFTEN et al. (1982), KHAN-DAWOOD e DAWOOD (1984) e ODDÓ e FORADORI (1987) que, estudando fragmentos de tecido colhidos no colo e no corpo uterino, demonstraram que, nos cortes histológicos oriundos da porção fúndica, a concentração dos RE é maior do que nas amostras vindas de tecidos do colo uterino. Os mesmos autores comprovaram maior incidência de RE nos cortes histológicos de miométrio oriundos de mulheres na menopausa ou de úteros com endométrio atrófico. O local da biópsia, na parede anterior ou posterior, não interferiu significativamente nos resultados.

MARUGO et al. (1989), estudando a ocorrência dos RE e dos RPg em leiomiomas uterinos, concluíram que os níveis dos receptores estavam sensivelmente mais elevados neste grupo do que nas células de miométrios normais.

CHRAPUSTA et al. (1990) e GADAN et al. (1990) admitem que o desenvolvimento dos leiomiomas uterinos esteja vinculado a irregularidades no metabolismo dos RE.

A presença dos RE e dos RPg, em níveis elevados, nas células miometriais de úteros portadores de nódulos miomatosos, também foi detectada por REIN et al. (1990). Os autores trataram as pacientes portadoras de úteros miomatosos com antagonistas do LH-RH, obtendo assim decréscimo dos níveis dos receptores hormonais, os quais retornaram a valores elevados após a interrupção do tratamento.

IACHELO et al. (1990), KAWAGUCHI et al. (1991) e SNIJDERS et al. (1992) confirmaram a existência dos RE e dos RPg nas células do miométrio. Em cortes histológicos de tecido miometrial colhidos ao final da fase proliferativa do ciclo menstrual de mulheres sadias, detectaram maior incidência dos RE. Verificaram também um sensível decréscimo da intensidade dos RE no segundo período do ciclo menstrual.

3.3 VAGINA

Poucos estudos avaliaram a presença dos receptores específicos aos estrogênios e à progesterona no epitélio vaginal.

WIEGERINCK et al. (1980) não encontraram alterações significativas nos níveis de concentração dos RE observados em cortes histológicos do epitélio vaginal. Em sua pesquisa, a intensidade com que aparecem os receptores estrogênicos no epitélio vaginal não se alterou nas duas fases do ciclo menstrual nem dependeu do local da mucosa vaginal onde foi realizada a biópsia. Os mesmos autores não encontraram qualquer correlação entre o nível dos RE das células do epitélio vaginal com os níveis hormonais plasmáticos ou com os diferentes grupos etários das mulheres estudadas.

Em estudo posterior, VAN HAAFTEN et al. (1982) confirmaram a presença dos RE em células do tecido vaginal.

Também GOULD et al. (1983) estudaram, *in vitro*, por técnica autoradiográfica o epitélio vaginal nas duas fases do ciclo menstrual. Evidenciaram nestas células a presença de granulações nucleares com intensidade variável. Maior intensidade de RE surgiram na primeira fase do ciclo.

DI CARLO et al. (1985), em seu estudo, mostraram que o grau de aparecimento dos RE nas células da mucosa vaginal não sofreu alterações significativas nas duas fases do ciclo menstrual nem é dependente do local em que é feita a coleta do fragmento epitelial. Analisando a intensidade do aparecimento de RE na mucosa vaginal de um grupo de pacientes na pré-menopausa e comparando com os resultados obtidos em outro grupo de mulheres na pós-menopausa, demonstraram que não há diferenças significativas.

O trabalho de PRESS et al. (1986) relata a existência dos RE nucleares em vários tecidos do aparelho genital feminino. Estudando as células da mucosa vaginal de mulheres em idade reprodutiva, os autores encontraram RE nas camadas basal, parabasal e intermediária. Na mesma pesquisa, os RE foram detectados com maior intensidade na fase proliferativa do que na fase lútea, achado sem significado estatístico.

Estendendo esta mesma investigação às mulheres na pós-menopausa, os resultados mostraram uma redução dos níveis dos RE. Esta, no entanto, não foi a conclusão de SJÖBERG et al. (1989) que demonstraram que os níveis dos RE sofrem mudanças, vinculadas possivelmente às modificações cíclicas a que o aparelho genital feminino está sujeito. Segundo estas observações, ocorre uma queda dos níveis dos RE citosólicos da fase proliferativa para a fase lútea. Estes autores admitem que esta variação seria um fator causal que poderia facilitar as infecções da área vaginal, especialmente as viróticas, por exemplo o papiloma vírus humano (HPV).

MAC LEAN et al. (1990) estudaram a presença dos RE nucleares em epitélio vaginal. Demonstraram a sua presença em mulheres na pós-menopausa com idade até 77 anos.

Foi WOLF et al. (1991) que, estudando a mucosa vaginal de mulheres na pré e pós-menopausa, sem qualquer tratamento hormonal, encontraram RE em 80% das células

pesquisadas. Os RE foram identificados nas diferentes camadas do epitélio vaginal, exceto na camada superficial.

GIOCCA et al. (1992), utilizando o método imunocitoquímico, correlacionaram as variações de intensidade dos RE com as infecções virais, tais como as infecções pelo HPV (papiloma vírus humano). Nas amostras vaginais de mulheres com infecção pelo HPV, houve uma redução de 20% na intensidade dos RE das células basais e parabasais da mucosa vaginal.

3.4 VULVA

Segundo as observações de GARAU et al. (1986) e de MAC LEAN et al. (1990), realizadas em cortes histológicos de tecido vulvar colhidos em mulheres no menacme ou no climatério, a intensidade dos níveis dos RE e dos RPg sofreram variações. Estes pesquisadores notaram um aumento dos dois tipos de receptores no período pós-menopausa. Quando foram estudadas mulheres portadoras de distrofias vulvares hiperplásicas, a concentração dos RE era maior nas mulheres em pré-menopausa.

A presença de ambos os receptores hormonais foi significativamente mais elevada na amostra de mulheres com doenças vulvares distróficas do que no grupo de mulheres hígidas.

3.5 OVÁRIOS

Nos folículos primordiais e nos folículos pré-antrais de ovários humanos não existem receptores de estrogênio nem receptores de progesterona, segundo IWAI et al. (1990). Na análise imunocitoquímica realizada por estes investigadores foram identificados receptores específicos somente nas células da granulosa do folículo antral.

Durante o período de ovulação, coincidindo com níveis sanguíneos elevados de LH, suas observações mostraram os receptores de progesterona nas células da granulosa. Os mesmos

persistem nas células do corpo lúteo e naquelas da granulosa que sofreram o processo de luteinização. A mesma pesquisa demonstrou que os RE regridem após a ovulação.

3.6 MAMAS

A avaliação da existência dos receptores de estrogênio nas mamas tem sido objeto de inúmeras pesquisas.

Estudos iniciais de BEATSON (1896), GLASCOCK e HOEKSTRA (1959) e FOLCA et al. (1961) demonstraram a dependência hormonal do câncer da mama.

TOFT e GORSKI (1966) evidenciaram que certas células tumorais são capazes de concentrar estrogênio, dependendo da sua afinidade a um RE citoplasmático.

Trabalhos posteriores de HÄHNEL et al. (1979), FURMANSKI et al. (1980), HOWAT et al. (1983), UNDERWOOD (1983), AAMDAL et al. (1984), WITTLIFF (1984), WRIGHT et al. (1987), HAWKINS et al. (1987) e CHEVALIER et al. (1988) evidenciaram que as mulheres com RE presentes nas células mamárias (RE positivas) apresentaram uma sobrevida maior, com um intervalo livre de doença mais amplo e de recorrência local menores do que aquele grupo de mulheres cujas células mamárias não possuíam RE (RE negativas).

KASTNER et al. (1986) analisaram a presença de RE e de RPg nas lesões benignas das mamas. Nas pacientes portadoras de displasias mamárias e de fibroadenomas detectaram a presença de RE nas células ductais e acinares, estando ausentes no estroma e nas células mioepiteliais.

3.7 OUTRAS LOCALIZAÇÕES DOS RE EM SERES DO SEXO FEMININO

No aparelho urinário, WILSON et al. (1984) detectaram os RE nos tecidos da uretra proximal e do trígono uretral. Na seqüência de sua investigação, nos mesmos cortes histológicos não encontraram RPg.

SMITH et al. (1990) estudaram a presença dos RE e dos RPg nos músculos do assoalho pélvico, nos ligamentos urogenitais e no miométrio. Em todas estas estruturas, exceto no músculo reto abdominal, foram detectados os RE e os RPg.

WOLF et al. (1991), utilizando técnica imunocitoquímica, pesquisaram simultaneamente amostras colhidas na bexiga e na mucosa vaginal, com o intuito de determinar a presença e a intensidade dos receptores hormonais. No colo vesical e na mucosa do fundo da bexiga, os RE e os RPg não estavam presentes, enquanto o epitélio vaginal apresentava quantidades variáveis destes receptores.

KHAN-DAWOOD e DAWOOD (1984) chamaram a atenção para a presença de receptores na decídua e na placenta. Níveis detectáveis de receptores citoplasmáticos e nucleares para o estradiol foram encontrados. O miométrio de grávidas não possui RE citoplasmáticos e o cório e o âmnio também não têm RE citoplasmático ou nuclear, afirmaram os pesquisadores. Entretanto, em cortes histológicos de decídua e de miométrio de grávidas, encontraram RPg no núcleo e no citoplasma. No cório e no âmnio, os RPg são negativos tanto no citoplasma como nos núcleos.

Em estudo de WANG et al. (1992), os RPg estão presentes no núcleo das células da decídua e no miométrio de grávidas. Suas observações confirmaram a presença destes receptores hormonais na decídua humana desde o primeiro trimestre de gestação, sendo mais fracas na camada de células superficiais da decídua. No entanto, a maior intensidade situa-se em células do endotélio dos vasos sanguíneos da decídua.

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAL E MÉTODO

1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Foram selecionadas ao acaso 49 mulheres adultas atendidas no Ambulatório de Ginecologia do Departamento de Tocoginecologia da Universidade Federal do Paraná.

A população incluída nesta investigação era formada por um grupo de pacientes destinadas a tratamento cirúrgico por via vaginal, por serem portadoras de procidências das paredes vaginais ou apresentarem algum grau de prolapso genital. As pacientes no menacme apresentavam ciclos menstruais regulares, sem patologia clínica ou endócrina evidente.

As mulheres, com idade entre 11 e 45 anos, foram inicialmente divididas em 2 grupos: o grupo A era constituído de 16 pacientes com idade entre 11 e 25 anos. O grupo B incluiu 33 mulheres com idade entre 26 e 45 anos (tabelas I e II).

Em cada uma das pacientes fez-se a identificação, anotaram-se os antecedentes clínicos e ginecológicos, a história menstrual, e registrou-se a fase do ciclo. O protocolo experimental previu a determinação dos níveis hormonais plasmáticos de FSH, LH, PR e E2 e a leitura do índice de maturação das células de desagregação da mucosa vaginal.

Foram realizados exames clínico e ginecológico em ambos os grupos, seguindo a rotina do Ambulatório de Ginecologia da Clínica Ginecológica do Departamento de Tocoginecologia da UFPR. Destas mesmas pacientes coletou-se material para pesquisar a presença RE citoplasmáticos nas células superficiais, intermediárias e profundas do epitélio vaginal.

TABELA I - GRUPO A - CARACTERÍTICAS GERAIS DO GRUPO DE MULHERES COM IDADE ENTRE 11 E 25 ANOS

IDENTIFICAÇÃO			NÍVEIS HORMONAIS				CITOLOGIA VAGINAL	INTENSIDADE DOS REc NA MUCOSA VAGINAL			CICLO MENSTRUAL	
CASO	INICIAIS	IDADE (anos)	FSH (mUI/ml)	LH (mUI/ml)	PR (ng/ml)	E2 (pg/ml)	IM	CAMADA PROFUNDA	CAMADA INTERMEDIÁRIA	CAMADA SUPERFICIAL	1ª FASE	2ª FASE
02	LV	22	1,00	8,00	11,00	80,00	0/80/20	++	++	0		+
03	AML	17	0,25	0,15	6,00	31,00	-	0	0	0		+
12	LRS	14	4,80	0,15	4,50	10,00	0/90/10	+	++	0		+
13	MAR	23	2,80	5,60	14,00	128,00	0/80/20	+	++	+	+	
17	BD	23	3,50	2,30	4,00	111,00	0/70/30	++	+++	+	+	
22	CMS	19	5,00	1,20	13,00	12,00	0/95/05	++	+++	+	-	-
23	SAFS	20	4,00	0,20	9,80	10,00	0/60/40	+	+++	+	+	
34	SRS	21	3,20	2,40	4,30	27,00	0/90/10	+	++	0	-	-
42	KSC	20	1,38	3,98	7,91	58,00	0/90/10	++	+++	+	+	
43	CKS	19	4,13	4,00	36,11	58,00	0/40/60	++	+++	0		+
44	MD	13	5,73	2,53	13,92	62,26	0/80/20	+	+++	0	+	
45	RM	14	5,53	2,55	9,30	52,00	0/80/20	++	+++	+	+	
46	VSG	23	6,15	5,15	33,45	45,00	0/70/30	++	++	+	+	
47	LF	13	8,00	14,64	11,39	62,57	0/70/30	+	+++	+		+
48	LCSB	13	4,97	3,26	5,68	25,25	0/60/40	+++	+++	+	+	
49	EC	13	6,00	8,20	14,00	14,00	0/90/10	++	++++	+	+	

TABELA II - GRUPO B - CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GRUPO DE MULHERES COM IDADE ENTRE 26 E 45 ANOS

IDENTIFICAÇÃO			NÍVEIS HORMONAIS				CITOLOGIA VAGINAL	INTENSIDADE DOS REc NA MUCOSA VAGINAL			CICLO MENSTRUAL	
CASO	INICIAIS	IDADE (anos)	FSH (mUI/ml)	LH (mUI/ml)	PR (ng/ml)	E2 (pg/ml)	IM	CAMADA PROFUNDA	CAMADA INTERMEDIÁRIA	CAMADA SUPERFICIAL	1ª FASE	2ª FASE
01	RLVS	38	20,00	19,00	19,00	44,00	0/80/90	++	+	0	+	
04	DTP	28	1,00	0,15	12,00	58,00	0/60/40	+	++	0		+
05	ES	37	0,40	0,15	14,30	131,00	0/80/20	+	++	0		+
06	IRB	41	8,00	0,15	8,60	52,00	-	+	+	+	+	
07	ALJ	35	1,80	0,90	6,80	39,00	0/60/40	0	++	+++		+
08	CDB	45	5,40	2,70	5,50	39,00	0/80/20	+	++	++	+	
09	SGL	31	10,50	24,50	18,00	51,00	0/90/10	-	-	-	+	
10	TCC	27	4,00	4,80	1,60	72,00	0/50/50	++	+	0	+	
11	RMO	38	4,20	5,20	3,20	200,00	0/50/50	0	+	+++		+
14	ASB	34	9,80	6,60	10,00	68,00	0/60/40	++	0	0	+	
15	TT	33	5,00	0,20	3,20	37,00	0/90/10	+	++	0		+
16	IMOG	27	1,90	2,00	18,00	200,00	-	+	+++	0	+	
18	MSD	27	10,00	25,00	5,00	47,00	0/50/50	+	++	0		+
19	MLB	28	9,50	0,15	8,80	72,00	0/70/30	++	++	+		+
20	VGSK	38	6,20	4,10	8,00	123,00	0/40/60	++	++	0	+	
21	ABR	40	6,00	2,00	18,00	34,00	0/95/05	-	-	-	+	
24	MSBQ	26	5,80	2,60	2,60	24,00	0/90/10	++	++	0	+	
25	DRO	34	1,40	0,20	9,60	127,00	-	+	++	0	+	
26	ACP	42	7,50	6,80	21,00	45,00	0/30/70	++	+++	0	+	
27	IR	38	2,80	3,90	3,20	80,00	0/30/70	+	+++	0		+
28	DLR	40	1,60	0,40	7,80	31,00	0/80/20	++	+++	+	+	
29	MFP	40	3,80	0,15	3,60	66,00	0/30/70	+	++	0	+	
30	VCT	28	4,50	5,30	15,00	46,00	0/80/20	++	+++	0	+	
31	ETT	44	7,40	2,30	23,00	100,00	0/20/80	+	+	++	+	
32	VMS	41	39,00	14,50	9,00	25,00	-	+	++	0		+
33	MLSM	43	30,00	12,00	4,00	64,00	0/80/20	+	++	0		+
35	IRM	38	4,00	6,00	8,00	102,00	0/80/20	++	+++	0		+
36	KM	37	1,84	1,66	9,00	18,00	0/60/40	+	++	0	+	
37	MBO	34	3,40	4,90	8,00	210,00	0/90/10	++	++	0		+
38	RLMF	38	9,96	7,38	10,75	120,00	0/30/70	++	+++	+	+	
39	EIAM	44	2,37	0,65	20,64	36,00	-	+	++	0	-	+
40	MGS	42	4,37	8,20	9,60	88,00	0/80/20	+++	+++	0	+	
41	VK	34	4,37	3,60	28,63	41,00	-	-	-	-	+	

Foram constituídos dois subgrupos etários para analisar a presença de RE nos extremos da vida reprodutiva. As mulheres mais jovens com idade entre 11 e 15 anos formaram o subgrupo I. No subgrupo II incluíram-se as pacientes com idade entre 40 e 45 anos.

2 COLETA DE MATERIAL

Durante o exame ginecológico, foram coletadas células de desagregação através do raspado das paredes anterolaterais do terço médio da mucosa vaginal, com auxílio de uma espátula de madeira. Após a coleta, foram realizados esfregaços em lâminas de vidro, as quais eram colocadas em frascos contendo álcool etílico absoluto para a fixação do material.

Foram coletados 10 ml de sangue venoso de todas as mulheres incluídas neste experimento, para a realização das dosagens plasmáticas de FSH, LH, PR e E2. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Medicina Nuclear do Hospital de Clínicas da UFPR. Não foi exigido jejum às pacientes para esta coleta de sangue.

No início do ato cirúrgico, foram coletados fragmentos da mucosa vaginal de cada uma das pacientes para a determinação dos receptores estrogênicos específicos. Na grande maioria dos casos, as pacientes foram anestesiadas por bloqueio peridural, utilizando-se 25 ml de marcaína a 0,5%.

As biópsias, realizadas no terço médio das paredes laterais, mediam 1 cm quadrado e atingiam profundidade suficiente para incluir células das três camadas características do epitélio vaginal (profunda, intermediária e superficial).

O tecido coletado era imediatamente depositado em um frasco contendo etanol a 100% e encaminhado ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR, para determinação da presença dos receptores de estrogênio citoplasmático (RE c), através de método imunocitoquímico.

As amostras foram coletadas de pacientes sem patologia infecciosa e sem terapêutica hormonal nos últimos 6 meses. Só foram incluídos no experimento tecidos que apresentavam textura normal, sem inflamação, metaplasia, displasia ou carcinoma.

3 TÉCNICAS DE LABORATÓRIO REALIZADAS NO ESTUDO

3.1 CITOLOGIA VAGINAL

Os esfregaços das paredes vaginais foram corados pela técnica universal descrita por Papanicolaou. A interpretação microscópica posterior permitiu identificar os diferentes tipos de células das diversas camadas do epitélio vaginal e estabelecer o índice de maturação (IM) existentes em cada esfregaço. O índice de maturação (IM) foi avaliado segunda a técnica clássica de PUNDEL (1952) e de SCHMITT (1953).

3.2 DOSAGENS HORMONAIS

Após a coleta do sangue venoso, o soro foi separado da porção celular através de centrifugação. Este soro foi armazenado em congelador a -20^{o}C por um período máximo de 7 dias.

Para as dosagens de FSH, LH e PR, pela técnica de radioimunoensaio (IRMA) utilizaram-se *kits* da **Serono Diagnostics** com anticorpos monoclonais. Esta técnica é de alta sensibilidade e especificidade. O ensaio consta de uma reação em que as amostras são incubadas a 37^{o}C por um tempo de 15 minutos (método 1) ou a temperatura ambiente por 60 minutos (método 2). Preferiu-se o método 2, utilizando-se uma mistura de anticorpos monoclonais específicos. Após a incubação foi adicionado o anticorpo antifluoresceína ligado a partículas magnéticas que acoplam-se ao complexo anticorpo monoclonal (FSH, LH e PR).

Este complexo era sedimentado em uma estante magnética, sendo a seguir lavado por 2 vezes em solução tampão para a lavagem do complexo precipitado.

A contagem final foi procedida em contador gama durante 1 minuto para cada amostra.

A sensibilidade desta técnica é:

	FSH	LH	PR
Método 1	0,25 mUI/ml	0,15 mUI/ml	0,3 ng/ml
Método 2	0,27 mUI/ml	0,3 mUI/ml	0,4 ng/ml

Para a determinação do nível de estradiol plasmático (E2), foi utilizada a técnica de radioimunoensaio de fase sólida *Coat a Count* através de um *kit* da **Diagnostics Prod. Corporation**, Los Angeles, USA.

Foram usados tubos plásticos revestidos nas paredes internas da base por anticorpos específicos para o E2, no qual foi colocado o soro. A seguir foi adicionado o estradiol marcado. O estradiol marcado por Iodo 125 compete com o estradiol das amostras das pacientes nos sítios de ligação dos anticorpos.

Procedeu-se a incubaçao a 37°C durante 60 minutos e a seguir separou-se a fração livre da fração ligada aos anticorpos. Finalmente, determinou-se o valor do E2 nas amostras através da leitura em contador gama.

A sensibilidade desta técnica é de 5 pg/ml.

3.3 RECEPTORES HORMONAIS DE ESTROGÊNIOS

Fragmentos do epitélio vaginal foram coletados e fixados em frascos contendo álcool etílico absoluto. Após 24 horas, os fragmentos foram cortados em pedaços menores de 4 mm de espessura e processados em um processador automático de tecidos **Autotechicon**. Neste processador, os cortes de tecidos foram desidratados em etanol 100%, com 4 banhos consecutivos de uma hora cada um.

Em seguida, as peças foram diafanizadas em xilol puro, com 3 banhos de 2 horas cada um e impregnadas com parafina fundida a 60°C, com 2 banhos de 4 horas cada um.

A seguir, as amostras do epitélio vaginal foram emblocadas em parafina. Os blocos foram fixados em suportes e cortados com a espessura de 4 a 5 micrômetros em um micrótomo rotatório de **Spencer**.

Estes cortes foram estendidos em banho-maria, a uma temperatura de 47°C, e a seguir montados em lâminas previamente revestidas com cola **Cascolar** azul (1 gota de cola para 100 ml de água destilada) para facilitar a adesão.

Os cortes foram desparafinizados com xilol por 30 minutos e então passados por uma série decrescente de soluções de etanol (100%, 80%, 70% e 50%) por 10 minutos em cada solução, para que fossem rehidratados, seguidos de um banho de água destilada de 15 minutos.

Para o estudo imunocitoquímico, utilizou-se o método PAP (peroxidase-antiperoxidase), conforme STERNBERGER (1979).

Para a utilização deste método foram empregados *kits* provenientes do **Biogenics Laboratories**, com anticorpos capazes de reconhecer, a nível citoplasmático, a presença do receptor citoplasmático para o E2, que é uma proteína específica de 29 kDa.

As lâminas foram previamente tratadas em solução contendo metanol e água oxigenada a 3%, com a finalidade de inibir a peroxidase endógena.

Os cortes foram delimitados com lápis de vídea, a fim de evitar que o anticorpo aplicado sobre o tecido se espalhasse.

Os cortes foram previamente incubados com o anticorpo monoclonal específico para o estrogênio por um período de 30 minutos à temperatura ambiente.

A fim de evitar o ressecamento dos cortes, as lâminas assim preparadas foram depositadas em câmara úmida.

Na etapa seguinte, as lâminas foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 5 minutos e incubadas com soro de ligação (antiimunoglobulina) durante 20 minutos em câmara úmida. Este soro foi pré-diluído e tem uma solução contendo PBS, 0,1% de azida sódica e 1% de soro humano.

Na seqüência, os cortes foram novamente lavados em PBS por 2 a 5 minutos e posteriormente incubados com PAP (peroxidase e antiperoxidase) por 20 minutos também em câmara úmida.

Com o intuito de ampliar a imunorreação, as lâminas foram incubadas com uma solução de 3-amino-9-etilcarbazol durante 15 a 40 minutos, substância que funciona como cromógeno.

Finalmente, os cortes foram lavados em água destilada e deionizada, e a seguir contracorados em hematoxilina de Mayer em um banho de 1 a 5 minutos.

As lâminas, ainda úmidas, foram montadas com lamínulas, usando-se *glycergel* para facilitar a adesão. Posteriormente, os cortes foram analisados em microscópio óptico com aumentos de 40, 70 e 280 vezes.

Para observação dos controles positivos, cortes histológicos de tecido mamário, coletados de pacientes com carcinoma de mama, comprovadamente RE positivo, foram processados, utilizando-se a mesma técnica imunocitoquímica acima descrita.

Os controles negativos foram processados da mesma forma, apenas omitindo-se a etapa da reação com o anticorpo primário.

Para a interpretação dos resultados obtidos após a observação ao microscópio óptico, foi convencionada a seguinte sistematização, a partir da intensidade da coloração das granulações citoplasmáticas das células:

Ausente	0(zero)	ausente
Coloração amarelo clara	+	intensidade discreta
Coloração amarelada	++	intensidade moderada
Coloração amarelo alaranjada	+++	intensidade forte
Coloração avermelhada	++++	intensidade acentuada

A presente sistematização deveu-se ao aspecto das granulações que tomavam uma coloração amarelo-clara, quando a intensidade era discreta (1 cruz), até a coloração avermelhada, quando esta intensidade era acentuada (4 cruzes).

Para uma análise conveniente e adequada interpretação, foram selecionadas as lâminas com os melhores cortes histológicos, ou seja, cortes íntegros em todas as camadas, sem a existência de superposições e com a coloração das células distribuída de modo uniforme e homogêneo.

3.4 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Nas amostras estudadas, foram analisadas as variáveis idade, fase do ciclo menstrual, dosagens hormonais (FSH, LH, PR e E2) e intensidade dos RE citoplasmáticos nas camadas superficial, intermediária e profunda, bem como o índice de maturação do epitélio vaginal, através de distribuições de freqüência e de cálculos estatísticos básicos.

A metodologia estatística, utilizada para a avaliação dos resultados obtidos pela verificação das diferenças entre os níveis dos hormônios nas duas fases do ciclo menstrual, foi realizada através do teste "U" de Mann-Whitney.

Os índices de maturação foram agrupados em 4 categorias, considerando-se os índices mais próximos. A fim de avaliar-se as diferenças entre os índices de maturação agrupados e as fases do ciclo menstrual, utilizou-se o teste do χ^2.

Tentando comparar a intensidade dos RE citoplasmáticos das camadas superficial, intermediária e profunda do epitélio vaginal com as fases do ciclo menstrual, buscou-se a significância estatística com o teste do χ^2.

Através do cálculo do coeficiente de correlação, foi investigada a correlação entre a intensidade dos REc das células das três camadas do epitélio com os resultados obtidos nas dosagens hormonais e com os diferentes grupos etários.

A significância estatística das variações da intensidade de REc das células das diversas camadas do epitélio vaginal nas 2 fases do ciclo, foi avaliada através do teste "t" de *Student*, tendo sido adotado o nível de significância de 5% para a rejeição das hipóteses de igualdade.

Estabeleceu-se, também, um modelo matemático de regressão que analisasse as variações de intensidade dos REc em diferentes períodos do ciclo menstrual. Foram calculados coeficientes de correlação entre as dosagens hormonais e as diferentes camadas do epitélio vaginal.

Na amostra estudada buscou-se a correlação através do teste χ^2 entre os diferentes grupos etários e as demais variáveis estudadas.

Para estabelecer-se a correlação do índice de maturação (IM) da citologia vaginal com a intensidade dos RE citoplasmáticos nas diversas camadas do epitélio vaginal foi empregado o teste exato de Fisher.

RESULTADOS

RESULTADOS

1 ASPECTOS GERAIS

Dividimos a amostra de 49 pacientes em grupos etários distintos e com intervalos de 5 anos. A tabela III nos mostra esta distribuição de freqüências e as análises estatísticas pertinentes. Pode-se observar que a idade média destas pacientes foi de 30,14 anos.

Por sua vez, a tabela IV mostra a distribuição destas 49 pacientes conforme as fases do ciclo menstrual em que se encontravam.

TABELA III - ANÁLISE DOS DIVERSOS GRUPOS ETÁRIOS - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS POR IDADE

GRUPOS ETÁRIOS (anos)	FREQÜÊNCIA	FREQÜÊNCIA RELATIVA	FREQÜÊNCIA ACUMULADA	FREQÜÊNCIA RELATIVA ACUMULADA
11 a 15	06	0,122	06	0,122
16 a 25	10	0,204	16	0,327
26 a 35	14	0,286	30	0,612
36 a 45	19	0,388	49	1,000

N = 49
Média = 30,14 anos
Desvio Padrão = 10,0229 anos

TABELA IV - FASES DO CICLO MENSTRUAL DE 49 PACIENTES - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS

FASES DO CICLO	FREQÜÊNCIA	FREQÜÊNCIA RELATIVA
0 (NÃO DETERMINADA)	02	0,0408
1ª (PRIMEIRA)	30	0,6123
2ª (SEGUNDA)	17	0,3469

Verifica-se que 30 pacientes estavam na 1ª fase do ciclo menstrual e que 17 pacientes se achavam na 2ª fase do ciclo.

2 PERFIL ENDÓCRINO

Com o intuito de avaliar o perfil endócrino destas pacientes foram determinados os níveis plasmáticos de diversos hormônios.

2.1 HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH)

Esta trofina hipofisária foi determinada em 49 pacientes e o seu valor médio foi de 6,22 mUI/ml, com um desvio padrão de 6,87 mUI/ml.

A tabela V mostra o estudo estatístico dos valores obtidos nas dosagens do FSH.

TABELA V - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS DOSAGENS PLASMÁTICAS DE FSH - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS

VALORES DO FSH (mUI/ml)	FREQÜÊNCIA	FREQÜÊNCIA RELATIVA	FREQÜÊNCIA ACUMULADA	FREQÜÊNCIA RELATIVA ACUMULADA
0,00 —| 2,00	10	0,2041	10	0,204
2,00 —| 4,00	09	0,1837	19	0,388
4,00 —| 6,00	16	0,3265	35	0,714
6,00 —| 8,00	06	0,1224	41	0,837
8,00 —| 10,00	04	0,0816	45	0,918
10,00 —| 12,00	01	0,0204	46	0,939
acima de 12,00	03	0,0612	49	1,000

N = 49
MÉDIA = 6,22755
DESVIO PADRÃO = 6,87

Os níveis de FSH obtidos não diferem significativamente nas duas fases do ciclo menstrual (figura 2).

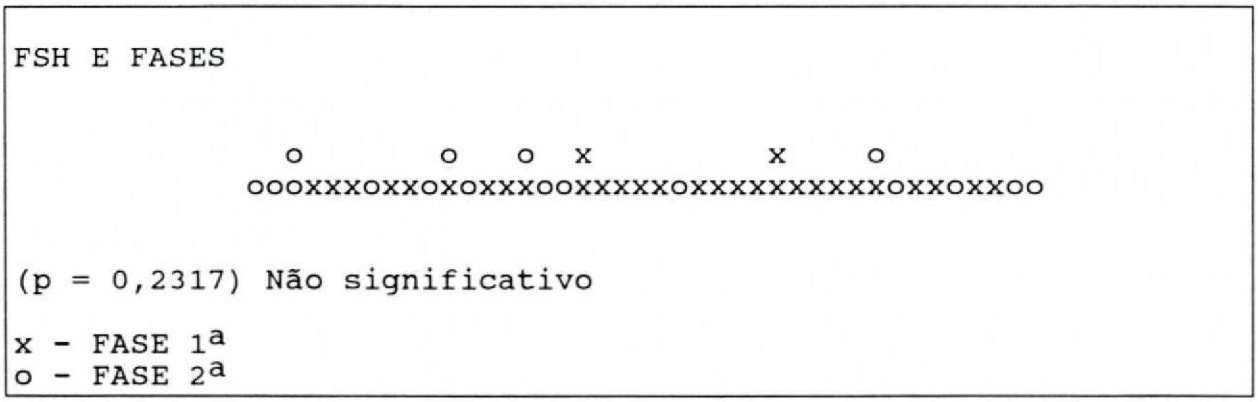


FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO DO FSH NAS DUAS FASES DO CICLO MENSTRUAL

Teste U de Mann-Whitney

A diferença dos valores de FSH determinados em sangue coletado na primeira fase do ciclo menstrual e do sangue coletado na segunda fase do ciclo não é estatisticamente significativa.

2.2 HORMÔNIO LUTEINIZANTE (LH)

Nas mesmas 49 pacientes foram determinados os valores plasmáticos do hormônio luteinizante. Os resultados mostraram o valor médio de 4,49 mUI/ml com o desvio padrão de 5,8427 mUI/ml.

Na tabela VI estão distribuídas as freqüências dos valores do LH plasmático.

TABELA VI - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS DOSAGENS PLASMÁTICAS DE LH - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS

VALORES DO LH (mUI/ml)	FREQÜÊNCIA	FREQÜÊNCIA RELATIVA	FREQÜÊNCIA ACUMULADA	FREQÜÊNCIA RELATIVA ACUMULADA
0,00 —| 1,50	14	0,2857	14	0,286
1,50 —| 3,00	10	0,2041	24	0,490
3,00 —| 4,50	06	0,1224	30	0,612
4,50 —| 6,00	07	0,1429	37	0,755
6,00 —| 7,50	03	0,0612	40	0,816
7,50 —| 9,00	03	0,0612	43	0,878
acima de 9,00	06	0,1224	49	1,000

N = 49
MÉDIA = 4,94796
DESVIO PADRÃO = 5,84275

A figura 3 evidencia a distribuição do LH nas duas fases do ciclo menstrual. Os valores obtidos demonstraram que os níveis não diferiam significativamente nas duas fases do ciclo menstrual ($p = 0,99$).

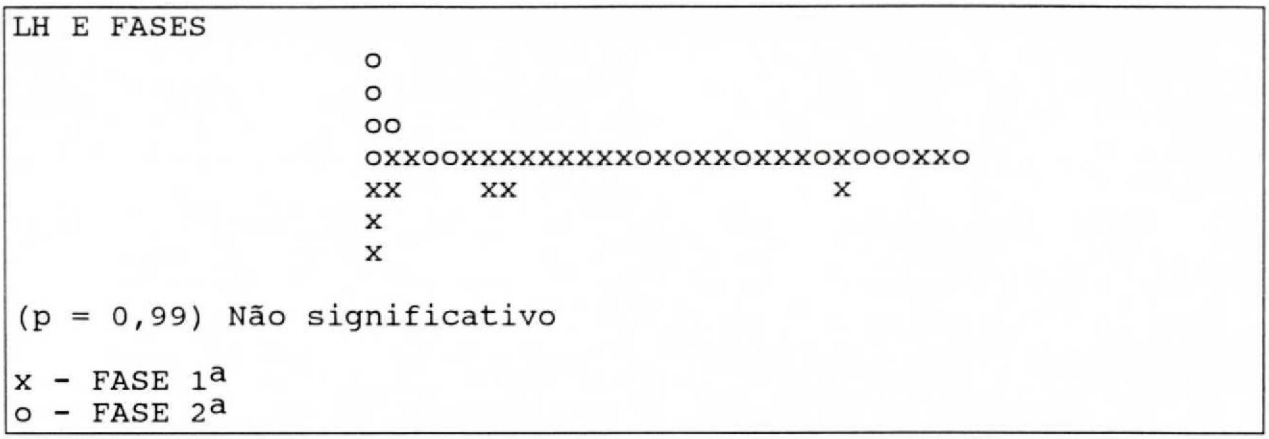


FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DO LH NAS DUAS FASES DO CICLO MENSTRUAL

Teste U de Mann-Whitney

Não há diferença estatisticamente significativa entre os valores de LH encontrados no plasma coletado na primeira fase do ciclo menstrual e os resultados de LH determinados em plasma coletado na segunda fase do ciclo.

2.3 PROLACTINA (PR)

Os níveis plasmáticos de prolatctina em 46 pacientes apresentaram a média de 9,86 ng/ml e um desvio padrão de 5,45 ng/ml.

A tabela VII mostra a distribuição de freqüências referentes a prolactina.

TABELA VII - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS DOSAGENS PLASMÁTICAS DE PROLACTINA - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS

VALORES DE PROLACTINA (ng/ml)	FREQÜÊNCIA	FREQÜÊNCIA RELATIVA	FREQÜÊNCIA ACUMULADA	FREQÜÊNCIA RELATIVA ACUMULADA
0,00 —| 4,00	08	0,1739	08	0,174
4,00 —| 8,00	12	0,2609	20	0,435
8,00 —| 12,00	13	0,2826	33	0,717
12,00 —| 16,00	06	0,1304	39	0,848
16,00 —| 20,00	04	0,0870	43	0,935
20,00 —| 24,00	03	0,0652	46	1,000

N = 46
MÉDIA = 9,86065
DESVIO PADRÃO = 5,45694

Correlacionando os níveis de prolactina do plasma com as fases do ciclo menstrual não encontramos significado estatístico (p = 0,1999).

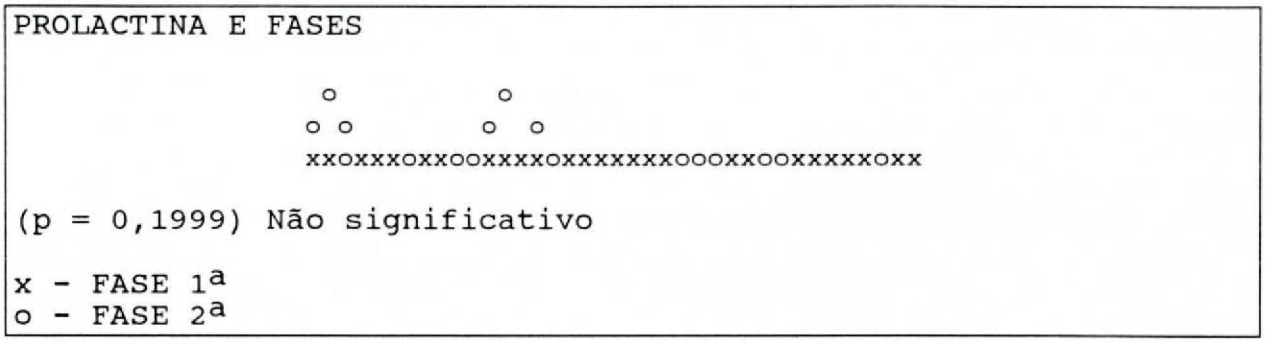


FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DA PROLACTINA NAS DUAS FASES DO CICLO MENSTRUAL
Teste U de Mann-Whitney
A diferença entre os valores de prolactina encontrados no plasma de mulheres coletado na primeira fase do ciclo menstrual e os valores achados no plasma coletado na segunda fase do ciclo menstrual não tem significado estatístico.

2.4 ESTRADIOL (E2)

As determinações laboratoriais dos níveis plasmáticos de estradiol demonstraram valores médios de 66,83 pg/ml no grupo estudado de 49 pacientes.

O desvio padrão foi de 48,11 pg/ml.

A tabela VIII mostra a distribuição de freqüências dos níveis plasmáticos de estradiol.

TABELA VIII - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS DOSAGENS PLASMÁTICAS DE ESTRADIOL - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS

VALORES DE ESTRADIOL (pg/ml)	FREQÜÊNCIA	FREQÜÊNCIA RELATIVA	FREQÜÊNCIA ACUMULADA	FREQÜÊNCIA RELATIVA ACUMULADA
0,00 —| 20,00	05	0,1020	05	0,102
20,00 —| 40,00	11	0,2245	16	0,327
40,00 —| 60,00	12	0,2449	28	0,571
60,00 —| 80,00	09	0,1837	37	0,755
80,00 —| 100,00	02	0,0408	39	0,796
100,00 —| 120,00	03	0,0612	42	0,857
120,00 —| 140,00	04	0,0816	46	0,939
acima de 140,00	03	0,0612	49	1,000

N = 49
MÉDIA = 66,83675
DESVIO PADRÃO = 48,1124

A correlação entre os valores do estradiol plasmático com as fases do ciclo menstrual das 49 pacientes incluídas na pesquisa foi negativa (p = 0,3135).

A figura 5 mostra esta distribuição.

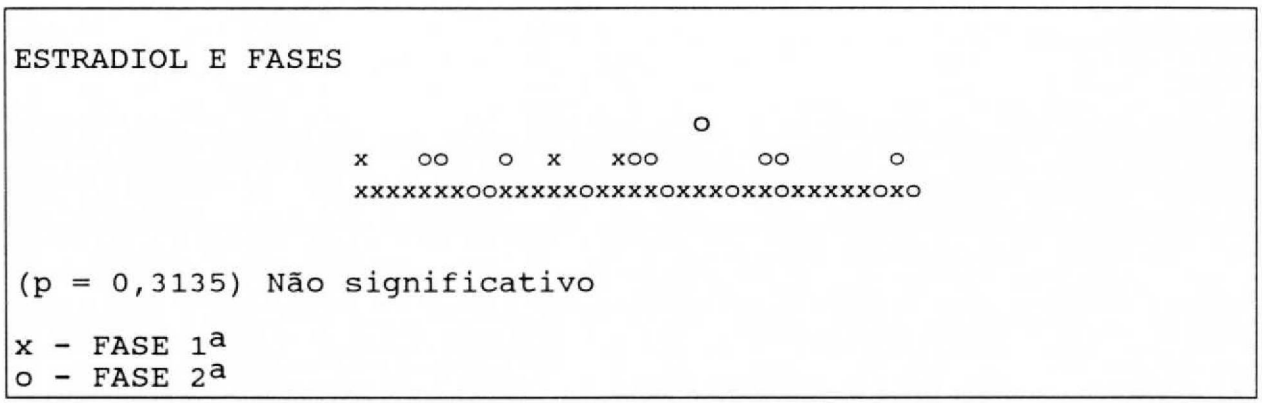


FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO DO ESTRADIOL NAS DUAS FASES DO CICLO MENSTRUAL
Teste U de Mann-Whitney
As dosagens de estradiol plasmático não mostraram diferenças significativas entre as mulheres que estavam na primeira fase do ciclo e aquelas que estavam na segunda fase.

3 CITOLOGIA VAGINAL HORMONAL

Para avaliar indiretamente o padrão hormonal das pacientes incluídas no experimento fez-se a leitura citológica dos raspados da parede vaginal, determinando-se o índice de maturação celular (IM) (tabela IX).

TABELA IX - CITOLOGIA VAGINAL HORMONAL - ÍNDICE DE MATURAÇÃO (IM) - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS

ÍNDICE DE MATURAÇÃO (IM)	FREQÜÊNCIA	FREQÜÊNCIA RELATIVA	FREQÜÊNCIA ACUMULADA	FREQÜÊNCIA RELATIVA ACUMULADA
0 / 20 / 80	01	0,0204	01	0,0204
0 / 30 / 70	04	0,0816	05	0,1020
0 / 40 / 60	02	0,0408	07	0,1429
0 / 50 / 50	03	0,0612	10	0,2041
0 / 60 / 40	06	0,1224	16	0,3265
0 / 70 / 30	04	0,0816	20	0,4082
0 / 80 / 20	11	0,2245	31	0,6327
0 / 90 / 10	09	0,1837	40	0,8163
0 / 95 / 5	02	0,0408	42	0,8571
NÃO DETERMINADO	07	0,1429	49	1,0000

N = 49

Os achados citológicos evidenciaram um perfil hormonal compatível com as faixas etárias das 42 pacientes estudadas. Em sete (7) mulheres a citologia hormonal não foi realizada por dificuldades técnicas.

A tabulação cruzada entre os índices de maturação (IM) e as fases do ciclo menstrual das mulheres incluídas na análise evidenciaram as variações características de cada uma das fases (tabela X).

TABELA X - CORRELAÇÃO DOS ÍNDICES DE MATURAÇÃO (IM) DA CITOLOGIA VAGINAL COM AS FASES DO CICLO MENSTRUAL

ÍNDICE DE MATURAÇÃO (IM)	FASES DO CICLO			TOTAL DE MULHERES
	NÃO DETERMINADO	1ª	2ª	
0 / 20 / 80 0 / 30 / 70	00	04	01	05
0 / 40 / 60 0 / 50 / 50	00	02	03	05
0 / 60 / 40 0 / 70 / 30	00	06	04	10
0 / 80 / 20 0 / 90 / 10 0 / 95 / 5	02	14	06	22
NÃO DETERMINADO	00	04	03	07
TOTAL	02	30	17	49

A tabela XI demonstra em tabulação cruzada a correlação entre o IM e os diversos grupos etários.

No grupo de pacientes com idade entre 26 e 35 anos predominou o IM 0/90/10.

Nas pacientes incluídas no grupo com idade acima de 36 anos o IM 0/80/20 foi o mais encontrado.

Os IM observados na citologia vaginal estão compatíveis com a faixa etária das pacientes pesquisadas.

TABELA XI - TABULAÇÃO CRUZADA ENTRE A IDADE DAS PACIENTES E OS ÍNDICES DE MATURAÇÃO (IM) DA CITOLOGIA VAGINAL

ÍNDICE DE MATURAÇÃO (IM)	IDADE (anos) 11 a 15	16 a 25	26 a 35	36 a 45	TOTAL DE MULHERES
0 / 20 / 80	00	00	00	01	01
0 / 30 / 70	00	00	00	04	04
0 / 40 / 60	00	01	00	01	02
0 / 50 / 50	00	00	02	01	03
0 / 60 / 40	01	01	03	01	06
0 / 70 / 30	01	02	01	00	04
0 / 80 / 20	02	02	01	06	11
0 / 90 / 10	02	02	04	01	09
0 / 95 / 5	00	01	00	01	02
NÃO DETERMINADO	00	01	03	03	07
TOTAL DE PACIENTES	06	10	14	19	49

4 RECEPTORES HORMONAIS CITOPLASMÁTICOS PARA O ESTROGÊNIO (REc)

Os RE citoplasmáticos foram investigados nos fragmentos de epitélio vaginal obtidos nas camadas profunda, intermediária e superficial.

4.1 RE CITOPLASMÁTICOS NAS CÉLULAS DA CAMADA PROFUNDA DO EPITÉLIO VAGINAL

Na camada profunda foram estudadas biópsias de mucosa vaginal oriundas de 46 mulheres, das quais três (3) não apresentaram RE citoplasmáticos.

A maioria dos epitélios analisados mostrou presença dos REc numa intensidade de + ou ++ (uma ou duas cruzes) (tabela XII, figuras 6 e 7).

TABELA XII - AVALIAÇÃO DOS REc NA CAMADA PROFUNDA DO EPITÉLIO VAGINAL - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS

PRESENÇA DE REc INTENSIDADE	FREQÜÊNCIA	FREQÜÊNCIA RELATIVA
0 (AUSENTE)	03	0,0612
+	21	0,4286
++	20	0,4082
+++	02	0,0408
NÃO DETERMINADO	03	0,0612

N = 49

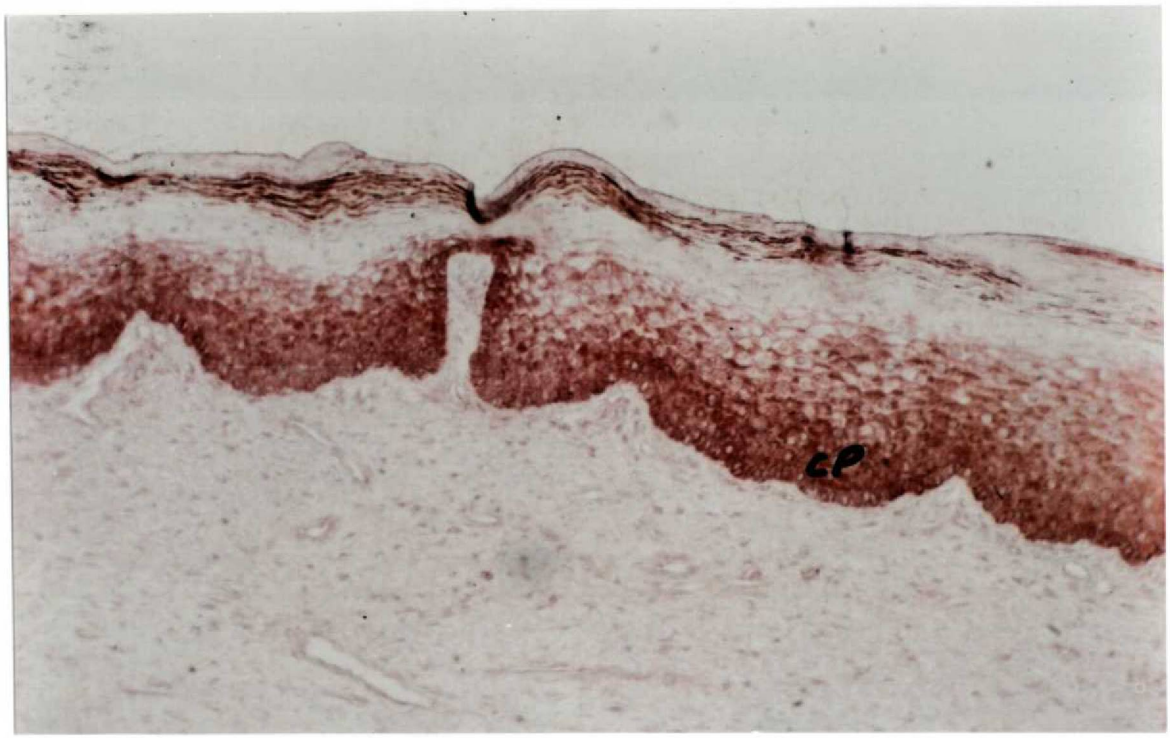


FIGURA 6 - CORTE HISTOLÓGICO DA MUCOSA VAGINAL. Caso nº. 48.
Paciente L.C.S.B., 13 anos, cursando a primeira fase do ciclo menstrual. As células da camada profunda do epitélio vaginal (CP) apresentam receptores estrogênicos citoplasmáticos com intensidade de +++ (três cruzes) após submetidas a processo imunocitoquímico.
Aumento microscópico: 70 X.

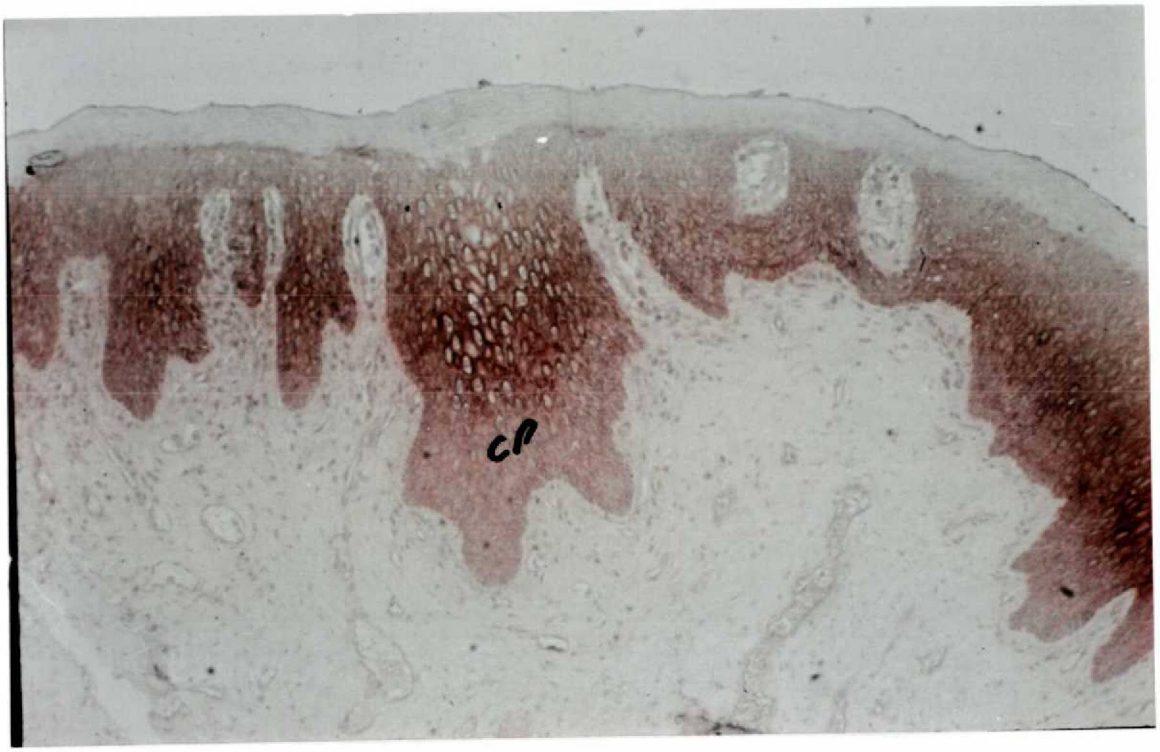


FIGURA 7 - CORTE HISTOLÓGICO DA MUCOSA VAGINAL. Caso nº. 19.
Paciente M.L.B., com 28 anos, na segunda fase do ciclo menstrual. As células da camada profunda (CP) apresentam receptores estrogênicos citoplasmáticos com intensidade moderada (++) no teste imunocitoquímico. Aumento microscópico: 40 X.

Buscando-se uma correlação entre intensidade dos REc encontrados nas células da camada profunda do epitélio vaginal de tecidos coletados na primeira fase do ciclo menstrual com a intensidade de REc observados nos cortes histológicos coletados em epitélio vaginal de pacientes que cursavam a segunda fase do ciclo menstrual não se acharam valores estatisticamente significativos (figura 8 e anexo I).

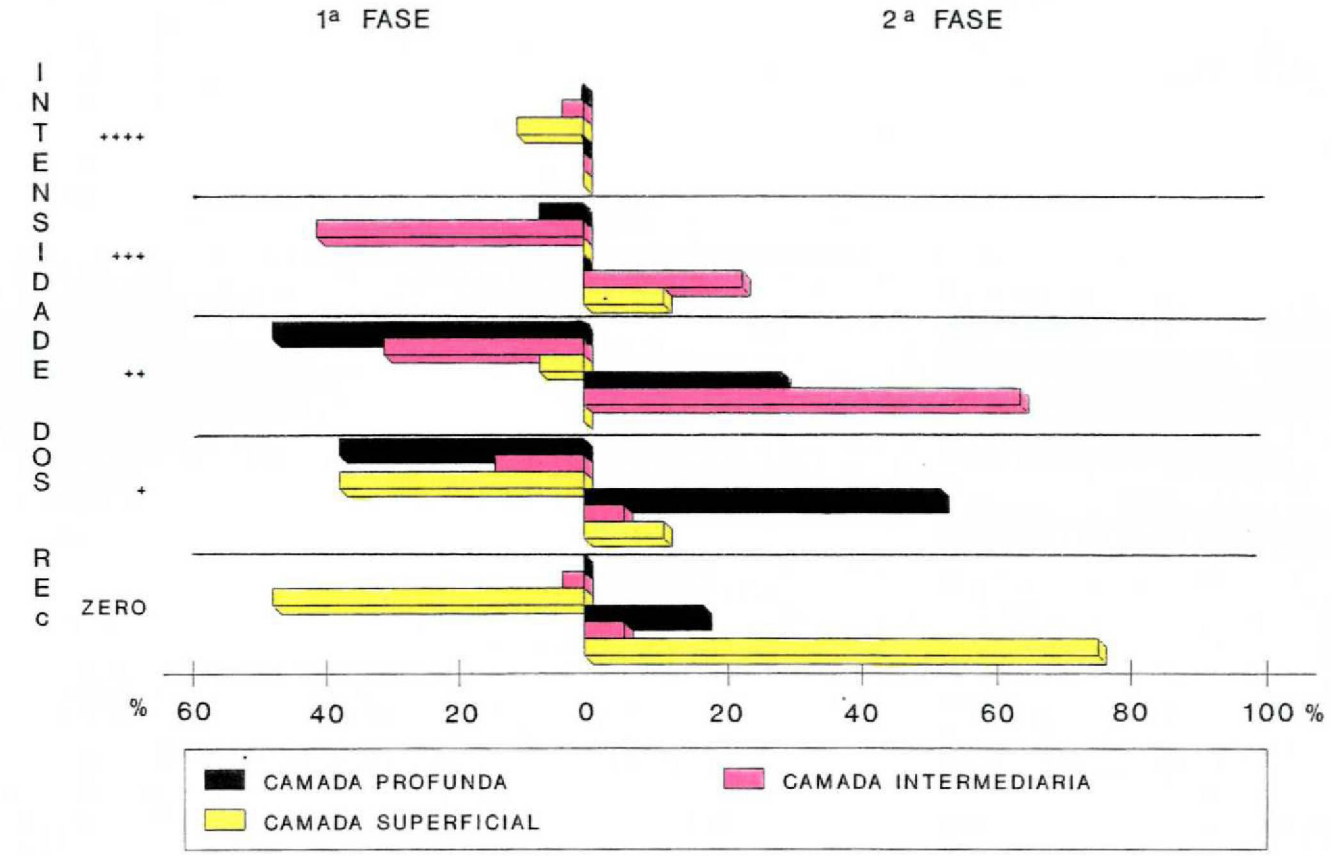


FIGURA 8 - INTENSIDADE DOS REc NAS CAMADAS PROFUNDA, INTERMEDIÁRIA E SUPERFICIAL NAS DUAS FASES DO CICLO MENSTRUAL

Na primeira fase do ciclo menstrual observa-se que 46,6% das pacientes tinham uma intensidade de REc de ++ (duas cruzes) e 36,7% a intensidade era de + (uma cruz). Por sua vez na segunda fase do ciclo menstrual os dados obtidos demonstram que 52,9% das pacientes tinham uma intensidade de REc de + (uma cruz) e 29,5% a intensidade de ++ (duas cruzes).

4.2 REc NAS CÉLULAS DA CAMADA INTERMEDIÁRIA DO EPITÉLIO VAGINAL

Na camada intermediária predominaram os níveis de REc com intensidade ++ ou +++ (duas ou três cruzes).

Em duas pacientes os REc não estavam presentes.

Por dificuldades técnicas não se determinou a intensidade dos REc em três pacientes (tabela XIII).

TABELA XIII - AVALIAÇÃO DOS REc NA CAMADA INTERMEDIÁRIA DO EPITÉLIO DA VAGINA - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS

PRESENÇA DE REc INTENSIDADE	FREQÜÊNCIA	FREQÜÊNCIA RELATIVA
0 (AUSENTE)	02	0,0408
+	05	0,1020
++	21	0,4286
+++	17	0,3469
++++	01	0,0204
NÃO DETERMINADO	03	0,0612

N = 49

Na figura 8 e anexo II vê-se que na primeira fase do ciclo menstrual, 30% das mulheres mostraram um nível de intensidade dos REc de ++ (duas cruzes) e 40% um nível de intensidade de REc de +++ (três cruzes) nas células do epitélio vaginal (figura 9).

Na segunda fase do ciclo, a maioria das pacientes (64,7%) tinham um nível de intensidade de REc de ++ (duas cruzes), enquanto num grupo de 23,5% das mulheres foram identificados níveis de +++ (três cruzes) (figura 10).

Pelos testes de K. Smirnoff e do χ^2 evidenciou-se que a presença dos REc nas células da camada intermediária do epitélio vaginal não depende da fase do ciclo menstrual em que se encontravam as mulheres estudadas.

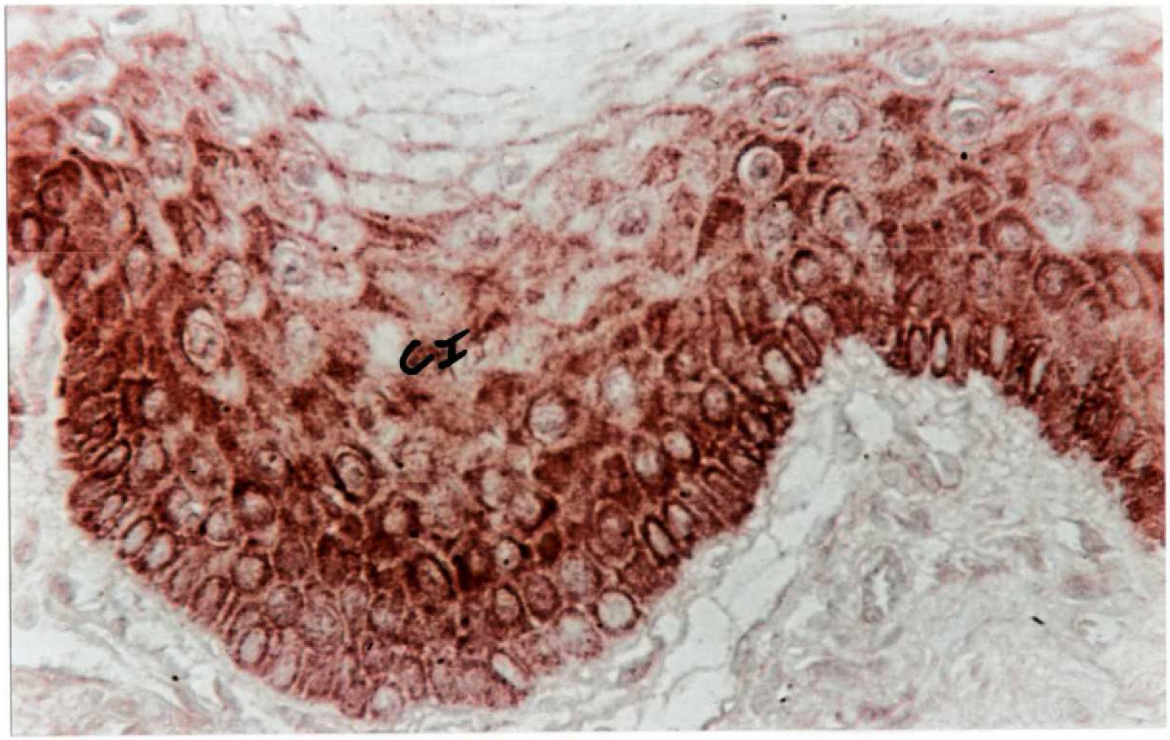


FIGURA 9 - CORTE HISTOLÓGICO DA CAMADA INTERMEDIÁRIA DA MUCOSA VAGINAL.
Este corte foi submetido a processo imunocitoquímico específico para determinação de RE citoplasmáticos. Paciente L.C.S.B., 13 anos, na primeira fase do ciclo menstrual. Caso nº. 48. RE citoplasmáticos com intensidade de +++ nas células da camada intermediária (CI).
Aumento microcópico: 280 X.

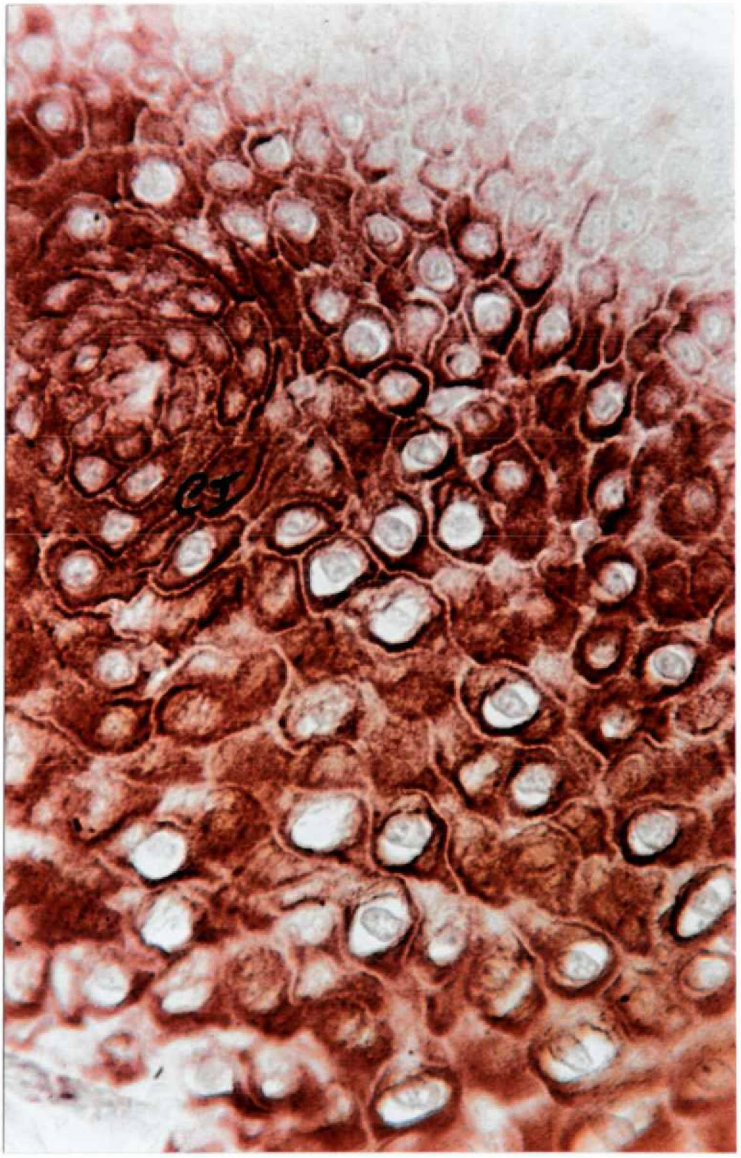


FIGURA 10 - DETALHE DE UM CORTE HISTOLÓGICO DA CAMADA INTERMEDIÁRIA DO EPITÉLIO VAGINAL.

Este corte foi submetido a processo imunocitoquímico específico. Os receptores estrogênicos citoplasmáticos de coloração avermelhada intensa estão presentes com intensidade de três cruzes (+++) (CI). Paciente M.L.B., com 28 anos, na segunda fase do ciclo menstrual. Caso nº. 19.
Aumento microscópico: 280 X.

4.3 REc NAS CÉLULAS DA CAMADA SUPERFICIAL DA MUCOSA VAGINAL

Os receptores hormonais específicos para o estrogênio foram investigados nas células superficiais do epitélio vaginal de 46 pacientes (tabela XIV).

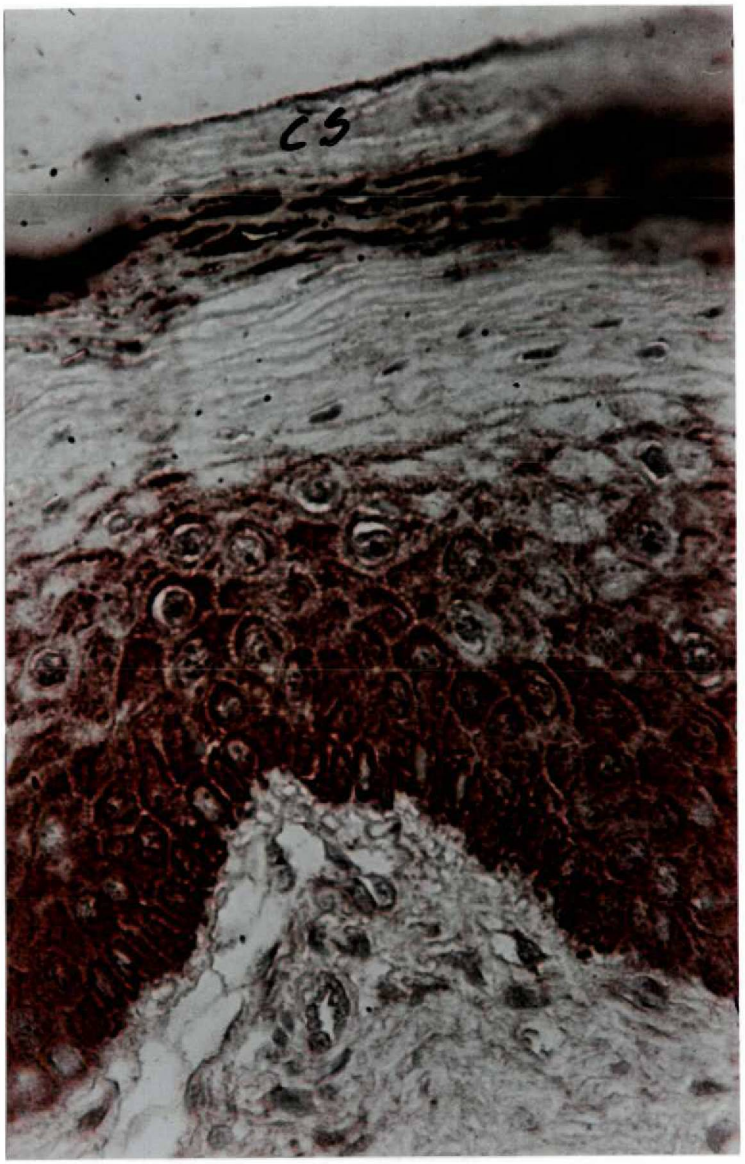
TABELA XIV - DISTRIBUIÇÃO DA INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA SUPERFICIAL DA MUCOSA VAGINAL - DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS

PRESENÇA DE REc INTENSIDADE	FREQÜÊNCIA	FREQÜÊNCIA RELATIVA
0 (AUSENTE)	28	0,5714
+	14	0,2857
++	02	0,0408
+++	02	0,0408
NÃO DETERMINADO	03	0,0612

N = 49

Os receptores hormonais citoplasmáticos para o estrogênio estavam ausentes nas células do epitélio vaginal superficial em 28 pacientes investigadas (figuras 11 e 12).

Em 14 mulheres incluídas nesta pesquisa os RE citoplasmáticos encontrados nas células superficiais da mucosa vaginal apresentavam um nível de intensidade classificadas com a intensidade de + (uma cruz).

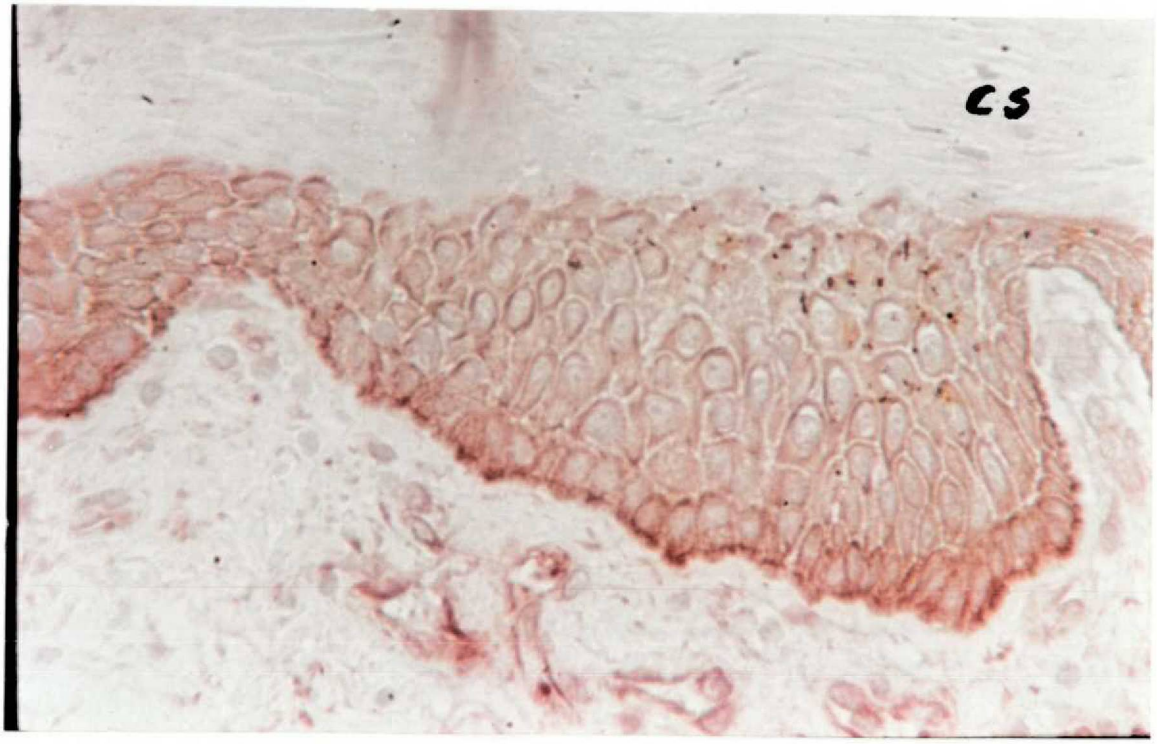


←

FIGURA 11 - CORTE HISTOLÓGICO DO EPITÉLIO VAGINAL SUBMETIDO A TRATAMENTO IMUNOCITOQUÍMICO.
A camada superficial (CS) com coloração clara mostra os RE citoplasmáticos com discreta intensidade (+). Caso nº. 48, paciente L.C.S.B., com 13 anos, na primeira fase do ciclo menstrual.
Aumento microscópico: 280 X.

FIGURA 12 - CORTE HISTOLÓGICO DA BIÓPSIA DE MUCOSA DO EPITÉLIO VAGINAL SUBMETIDO A TESTE IMUNOCITOQUÍMICO.
O citoplasma das células da camada superficial (CS) não apresentam receptores estrogênicos citoplasmáticos. Caso nº. 39, paciente E.I.A.M., com 44 anos, na segunda fase do ciclo menstrual.
Aumento microscópico: 70 X.

↓



A correlação entre as fases do ciclo e a intensidade dos receptores hormonais de estrogênio encontrados nas células da camada superficial do epitélio vaginal não foi estatisticamente significativo (figura 8 e anexo III).

A fim de verificar se os diferentes graus de intensidade dos RE citoplasmáticos encontrados nas células do epitélio vaginal em cada uma das camadas epiteliais estudadas (superficial, intermediária e profunda) estão correlacionados com o nível em que a amostra foi colhida, fez-se uma avaliação estatística através de tabulação cruzada.

Tabulando-se o grau de intensidade dos RE citoplasmáticos existentes na camada profunda, e comparando-se com a intensidade dos RE citoplasmáticos achados nas células da camada superficial encontrou-se uma correlação negativa a um nível de significância $p<0,05$.

TABELA XV - TABULAÇÃO CRUZADA CORRELACIONANDO OS NÍVEIS DE INTENSIDADE DOS REc NAS CAMADAS PROFUNDA E SUPERFICIAL DO EPITÉLIO VAGINAL

CAMADA SUPERFICIAL / INTENSIDADE REc	CAMADA PROFUNDA INTENSIDADE REc: 0 (AUSENTE)	+	++	+++	NÃO DETERMINADO	TOTAL DE MULHERES
0 (AUSENTE)	01	15	11	01	00	28
+	00	04	09	01	00	14
++	00	02	00	00	00	02
+++	02	00	00	00	00	02
NÃO DETERMINADO	00	00	00	00	03	03
TOTAL DE PACIENTES	03	21	20	02	03	49

Quando se estabeleceu uma tabulação cruzada entre os REc achados nas células das camadas intermediárias e se comparou com os REc achados nas células da camada superficial, os resultados revelaram correlação estatisticamente negativa ($p < 0,05$) (tabela XVI).

TABELA XVI - TABULAÇÃO CRUZADA CORRELACIONANDO A INTENSIDADE DOS REc NAS CAMADAS INTERMEDIÁRIA E SUPERFICIAL DO EPITÉLIO DA VAGINA

CAMADA SUPERFICIAL	CAMADA INTERMEDIÁRIA INTENSIDADE REc						TOTAL DE
INTENSIDADE REc	0 (AUSENTE)	+	++	+++	++++	NÃO DETERMINADO	MULHERES
0 (AUSENTE)	02	02	16	08	00	00	28
+	00	01	03	09	01	00	14
++	00	01	01	00	00	00	02
+++	00	01	01	00	00	00	02
NÃO DETERMINADO	00	00	00	00	00	03	03
TOTAL DE PACIENTES	02	05	21	17	01	03	49

No entanto, a correlação foi positiva a um nível de probabilidade de $p = 0,059$ quando se tabulou a intensidade dos REc observados nas células da camada intermediária e se correlacionou com a intensidade dos REc identificados na camada profunda (tabela XVII).

TABELA XVII - TABULAÇÃO CRUZADA CORRELACIONANDO A INTENSIDADE DOS REc NAS CAMADAS INTERMEDIÁRIA E PROFUNDA DO EPITÉLIO VAGINAL

CAMADA PROFUNDA / INTENSIDADE REc	CAMADA INTERMEDIÁRIA INTENSIDADE REc						TOTAL DE MULHERES
	0 (AUSENTE)	+	++	+++	++++	NÃO DETERMINADO	
0 (AUSENTE)	01	01	01	00	00	00	03
+	00	02	14	05	00	00	21
++	01	02	06	10	01	00	20
+++	00	00	00	02	00	00	02
NÃO DETERMINADO	00	00	00	00	00	03	03
TOTAL DE PACIENTES	02	05	21	17	01	03	49

4.4 AVALIAÇÃO DOS RE CITOPLASMÁTICOS NAS TRÊS CAMADAS DO EPITÉLIO VAGINAL EM DIFERENTES GRUPOS ETÁRIOS

No grupo A, formado por 16 mulheres com idade compreendida entre 11 e 25 anos, a intensidade dos REc foi de ++ (duas cruzes) em 50% das células da camada profunda dos epitélios estudados. Já no grupo B que compreendia 33 mulheres com faixa etária entre 26 e 45 anos, o nível de intensidade dos REc era de + (uma cruz) em 45,5% das pacientes e de ++ (duas cruzes) em 36,4% das pacientes (figura 13 e anexo IV).

Em nenhuma paciente estudada foram observados REc de intensidade acentuada (++++).

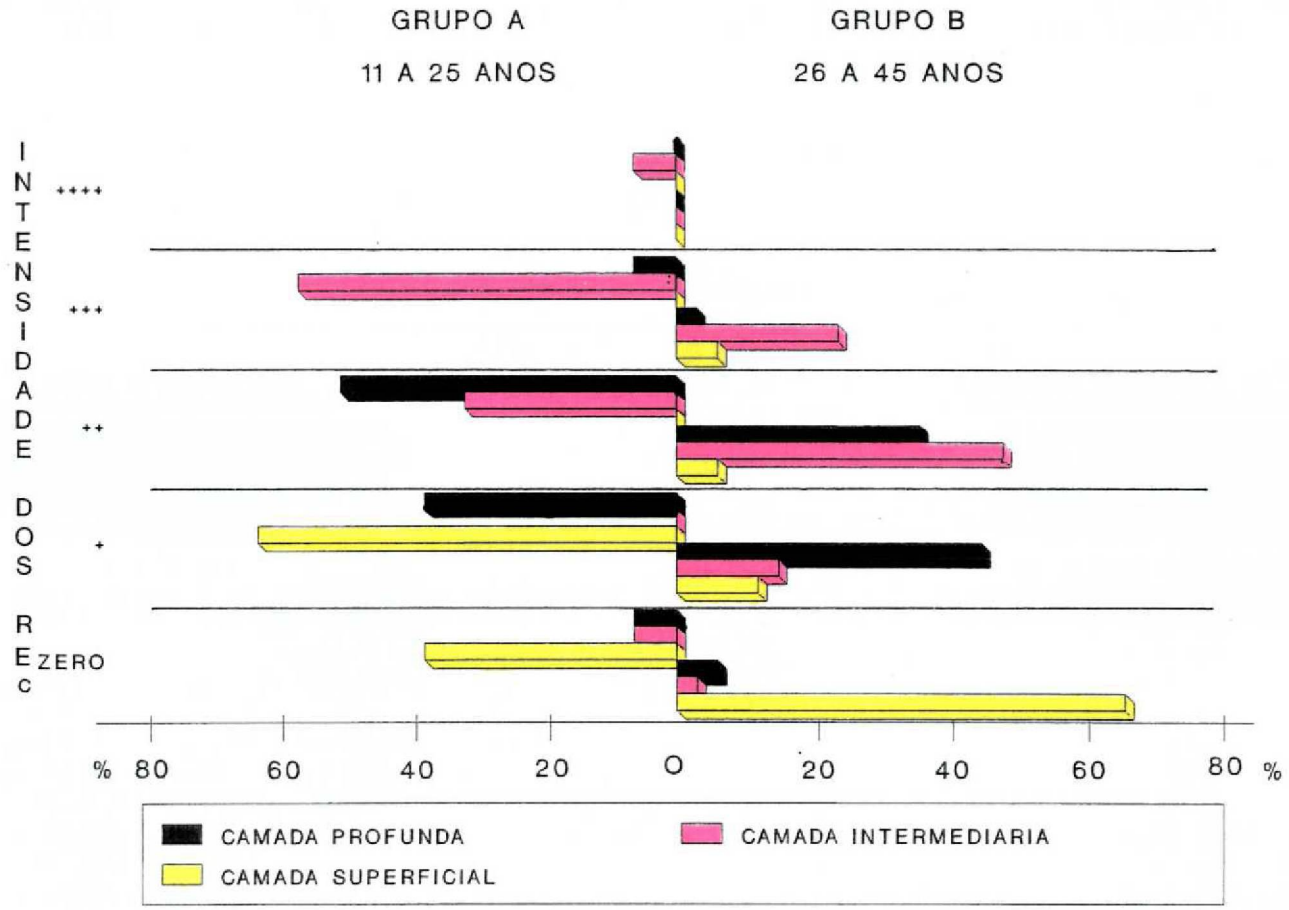


FIGURA 13 - INTENSIDADE DOS REc NAS CAMADAS PROFUNDA, INTERMEDIÁRIA E SUPERFICIAL EM DIFERENTES GRUPOS ETÁRIOS

As diferenças de intensidade dos RE citoplasmáticos das células da camada profunda nos dois grupos etários não tem significado estatístico ($p = 0,51$).

Correlacionando-se a intensidade de REc das células vaginais da camada intermediária com os dois grupos etários estudados, observa-se que 56,3% das mulheres agrupadas na faixa etária de 11 a 25 anos tinham nível de intensidade de REc de +++ (três cruzes) e 31,3% apresentavam uma intensidade ++ (duas cruzes), enquanto 48,5% das mulheres agrupadas na faixa etária de 26 a 45 anos apresentavam uma intensidade de ++ (duas cruzes) e 24,2% a intensidade era de +++ (três cruzes). Neste grupo não se observou REc com níveis de intensidade de ++++ (quatro cruzes) (figura 13 e anexo V).

As variações de intensidade de RE citoplasmáticos das células da camada intermediária nos dois grupos etários é estatisticamente significativa a um nível de probabilidade de p=0,03991, demonstrando-se que as pacientes com mais idade apresentam maior intensidade dos REc na camada intermediária do epitélio vaginal.

A análise dos níveis de intensidade dos REc encontrados na camada superficial não evidenciaram correlação estatisticamente significativa (p = 0,074).

As células do epitélio vaginal da maioria das mulheres (62,5%) com idade compreendida entre 11 e 25 anos apresentaram intensidade dos REc na camada superficial de + (uma cruz). Em 37,5% das células da camada superficial os REc estavam ausentes.

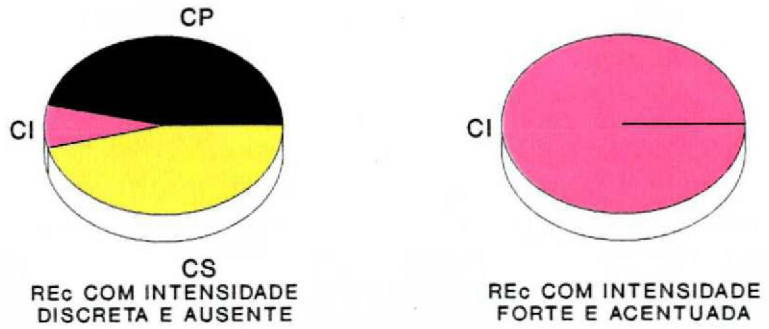
No grupo B, não foram detectados REc em 66,7% das células epiteliais da camada superficial da mucosa vaginal. Apenas 12,2% das células superficiais mostraram receptores de estrogênio com níveis de intensidade de + (uma cruz) (figura 13 e anexo VI).

A fim de avaliar a influência da idade das mulheres estudadas sobre a intensidade dos REc encontrados nas células epiteliais das três camadas do epitélio investigado, subdividimos a amostra em dois subgrupos:

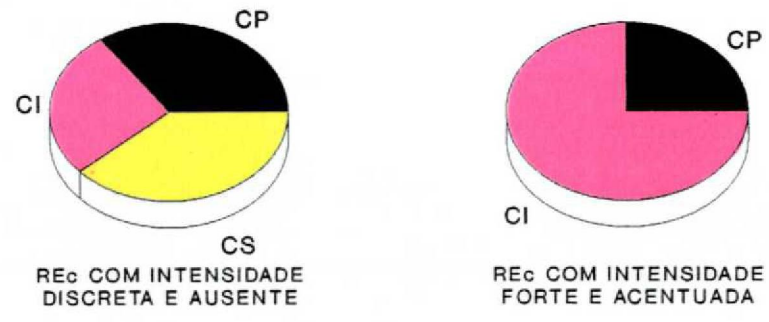
Subgrupo I = pacientes com idade entre 11 e 15 anos;

Subgrupo II = pacientes com idade entre 40 e 45 anos.

A - PACIENTES COM IDADE ENTRE
11 E 15 ANOS (SUBGRUPO I)



B - PACIENTES COM IDADE ENTRE
40 E 45 ANOS (SUBGRUPO II)



CP = CAMADA PROFUNDA
CI = CAMADA INTERMEDIARIA
CS = CAMADA SUPERFICIAL

FIGURA 14 - INTENSIDADE DOS REc DAS CÉLULAS DO EPITÉLIO VAGINAL EM DOIS SUBGRUPOS ETÁRIOS - I E II (EXTREMOS DA VIDA REPRODUTIVA)

Os gráficos representam o estudo comparativo entre a intensidade de REc encontrados nas 3 camadas do epitélio vaginal de pacientes jovens (idade entre 11 e 15 anos) e pacientes de faixa etária mais avançada, próximas do final da idade reprodutiva (subgrupo II - idade entre 40 e 45 anos).

As pacientes jovens incluídas no subgrupo I não apresentaram REc de intensidade forte e acentuada nas camadas profunda e superficial. Nesta faixa etária predominaram os REc com intensidade forte e acentuada na camada intermediária.

Observando-se a intensidade dos REc das pacientes com idade entre 40 e 45 anos (subgrupo II), constata-se que a maioria delas não apresentaram receptores de intensidade forte ou acentuada nas camadas profunda e superficial, enquanto que os receptores de discreta intensidade ou ausentes predominaram em todas as camadas do epitélio vaginal.

Na camada intermediária, mais sensível aos efeitos estrogênicos predominaram os REc de intensidade forte e acentuada investigados no grupo de pacientes jovens, enquanto que, na maioria das pacientes do subgrupo II, mais próximas do término da vida reprodutiva, os receptores estrogênicos de intensidade zero (ausentes) ou discreta eram predominantes (figura 14 e anexo VII).

5 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DOS REc COM OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS HORMÔNIOS FSH, LH, PR E E2

Ao analisarmos a intensidade dos RE citoplasmáticos encontrados nos cortes histológicos das 3 camadas do epitélio vaginal temos que considerar a possibilidade de ocorrerem variações por influência das alterações hormonais. Foram calculados os coeficientes de correlação entre os diferentes valores encontrados nas dosagens de FSH, LH, PR e E2 plasmáticos e o grau de intensidade dos REc identificados nas diferentes camadas celulares do epitélio vaginal.

Buscando-se o significado da influência do hormônio folículo-estimulante sobre a intensidade dos REc encontrados em células da camada profunda dos preparados histológicos oriundos das biópsias da mucosa vaginal da população de 49 mulheres estudadas, encontramos o coeficiente de correlação $r = 0,01140$, o que nos permite afirmar que neste experimento não existe correlação entre os valores de FSH plasmáticos e a intensidade de REc (figura 15).

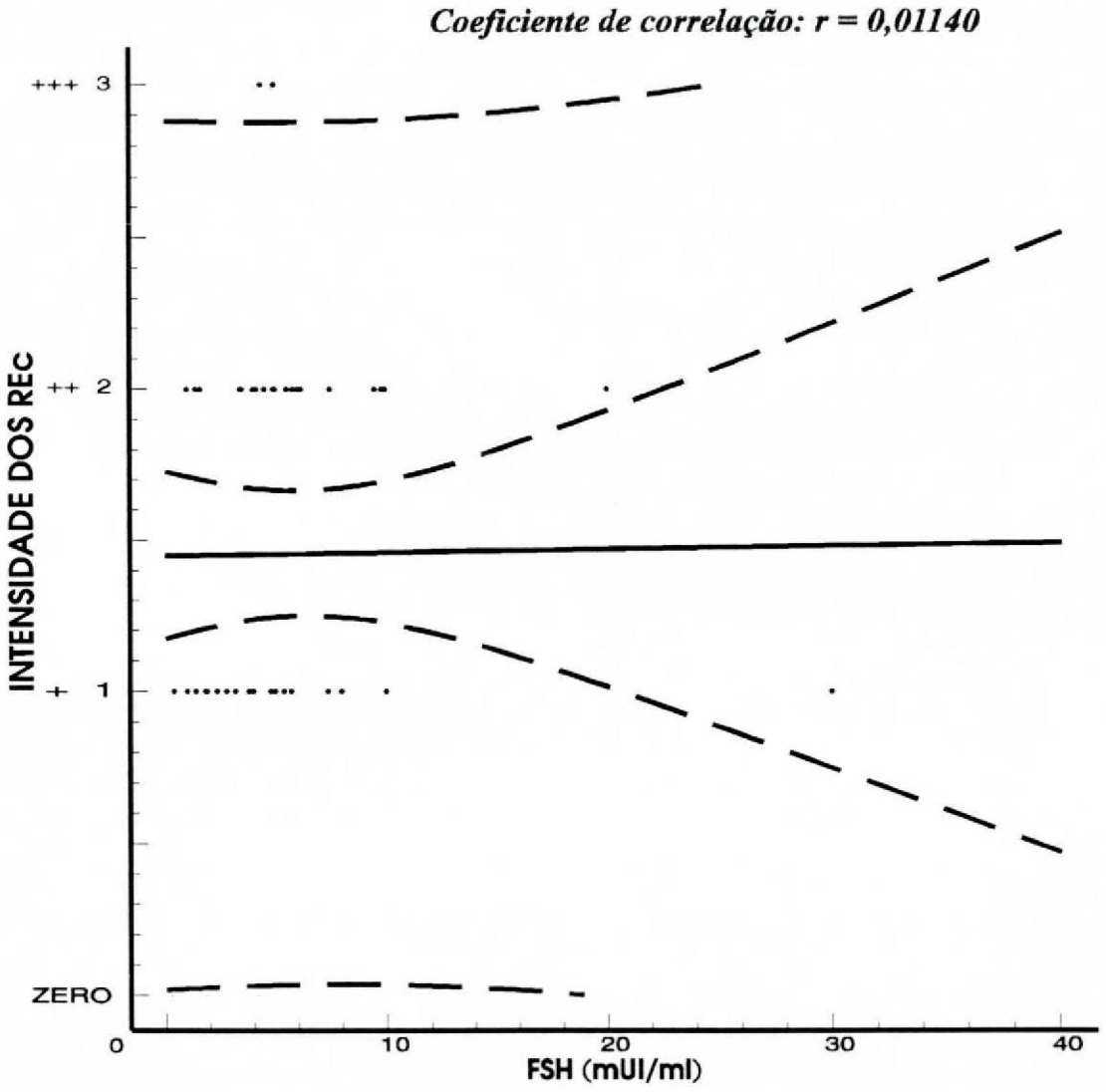


FIGURA 15 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA PROFUNDA DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DO FSH PLASMÁTICO

A correlação entre as dosagens de FSH plasmático (mUI/ml) e o grau de intensidade dos REc das células da camada profunda do epitélio vaginal é negativa.

Os pontos representam a distribuição dos casos clínicos e a correlação da intensidade dos REc com os níveis plasmáticos de FSH.

A linha central indica a reta de regressão e as linhas tracejadas próximas indicam o intervalo de confiança, enquanto as linhas externas nos revelam o intervalo de previsão ao nível de 95%.

Tabulando-se os valores de FSH plasmáticos contra o grau de intensidade dos REc encontrados nas células da camada intermediária do epitélio vaginal não se encontrou correlação (coeficiente de correlação r = -0,1329) (figura 16).

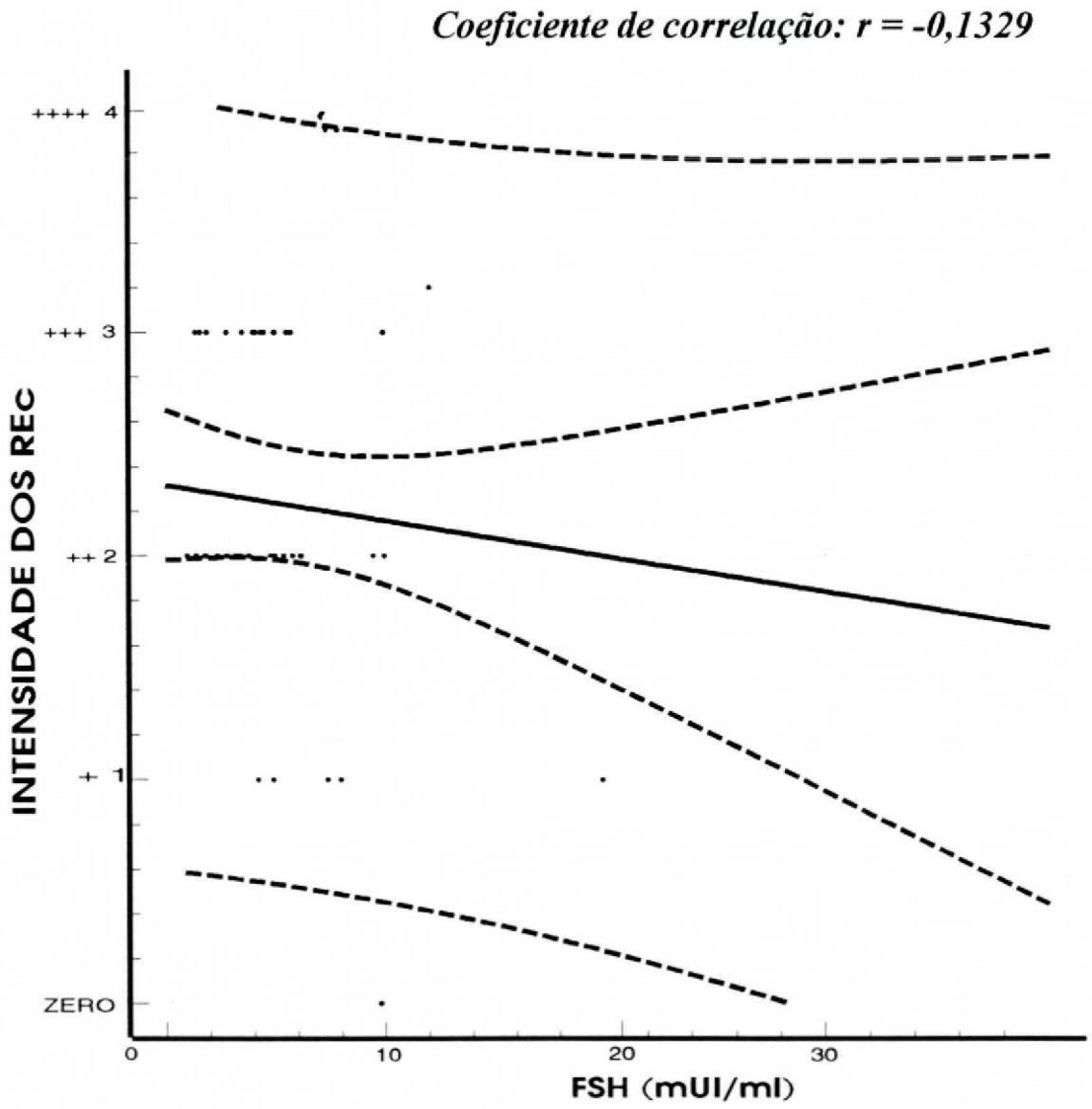


FIGURA 16 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA INTERMEDIÁRIA DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DO FSH PLASMÁTICO

A correlação entre as dosagens de FSH plasmático (mUI/ml) e o grau de intensidade dos REc das células da camada intermediária não foi estatisticamente significativa.

Não há correlação entre os valores de FSH plasmático e o grau de intensidade dos REc das células superficiais dos cortes histológicos estudados (figura 17).

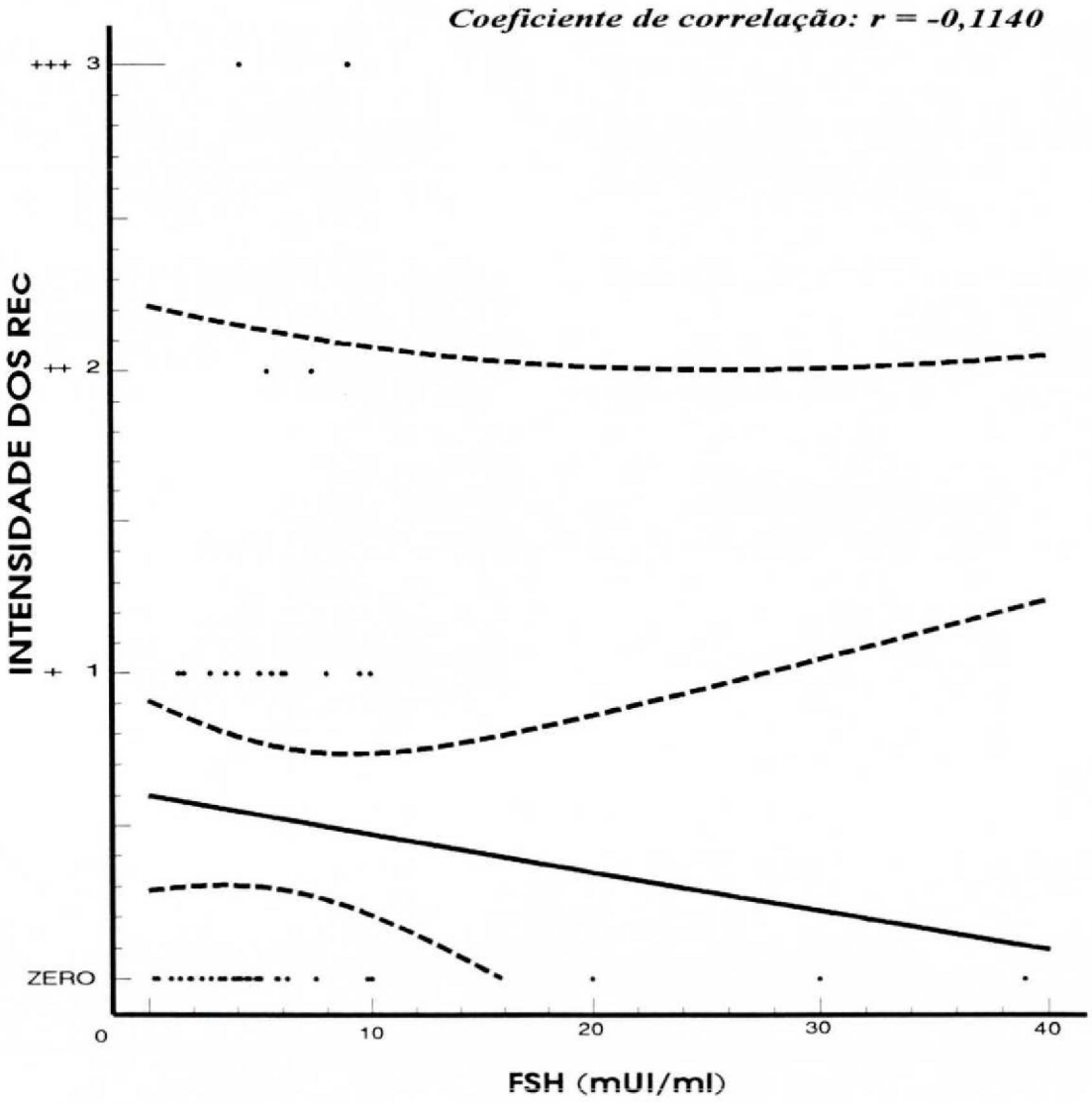


FIGURA 17 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA SUPERFICIAL DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DO FSH PLASMÁTICO

Correlacionando o grau de intensidade dos REc das células da camada superficial com as dosagens de FSH plasmático (mUI/ml) não foi encontrada significância estatística.

Para estudar a correlação entre os valores plasmáticos do hormônio luteinizante e o grau de intensidade dos RE citoplasmáticos encontrados nas três camadas do epitélio vaginal, construíram-se módulos estatísticos para calcular o coeficiente de correlação.

Nas camadas profunda, intermediária e superficial não encontramos correlação significativa (figuras 18, 19 e 20).

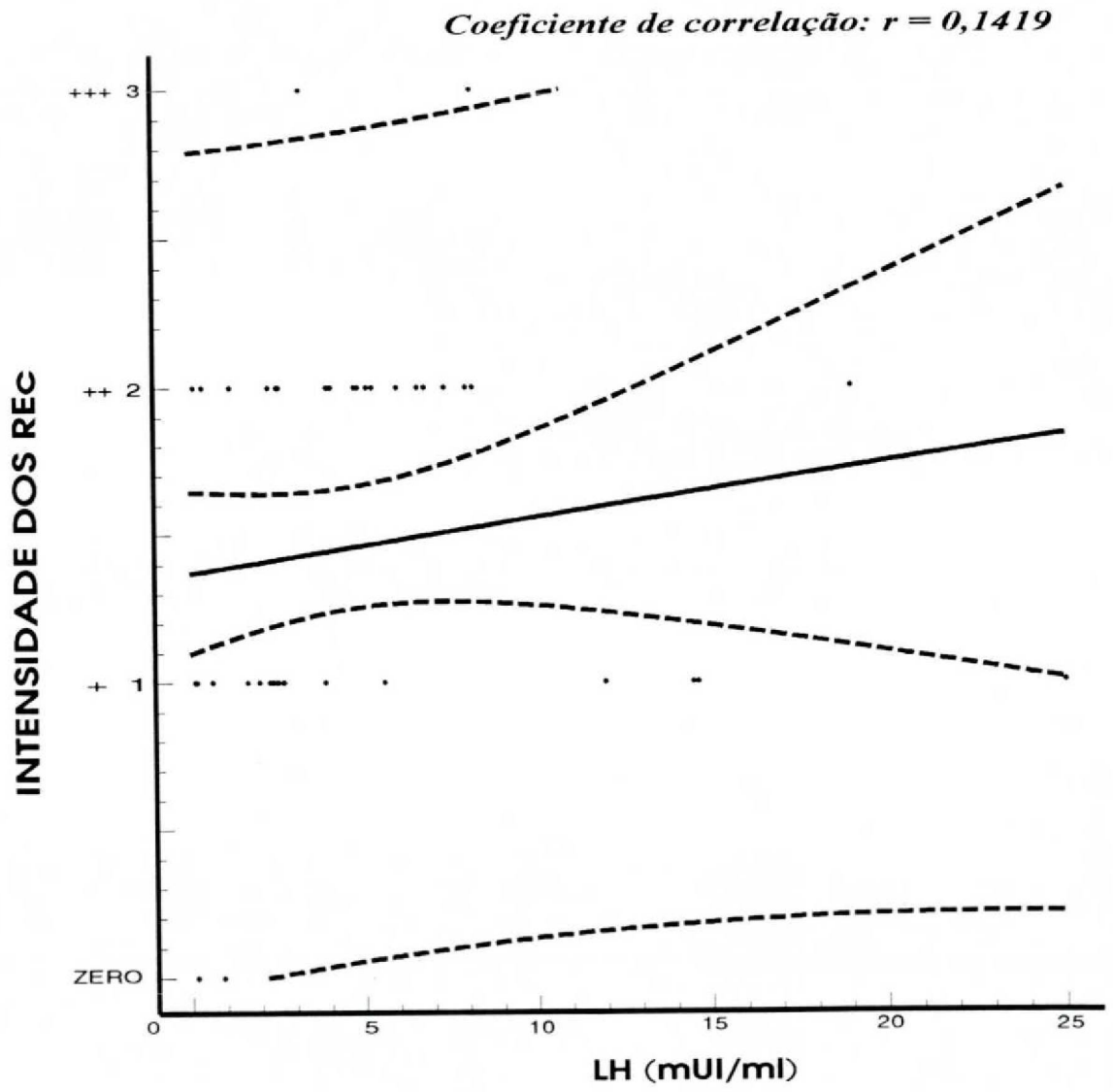


FIGURA 18 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA PROFUNDA DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DO LH PLASMÁTICO

A correlação entre as dosagens de LH plasmático (mUI/ml) e o grau de intensidade dos REc das células da camada profunda não foi significativa estatisticamente.

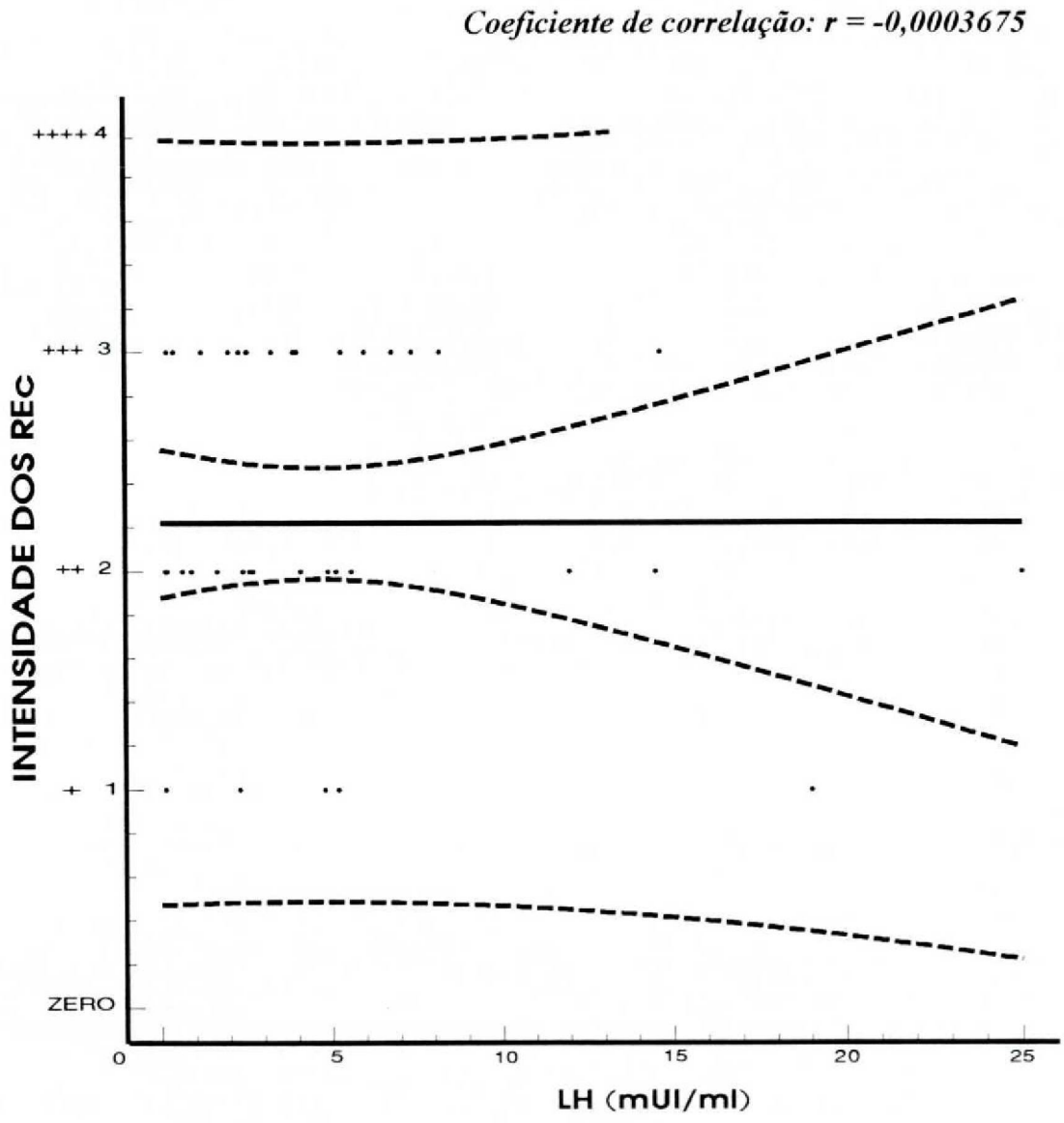


FIGURA 19 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA INTERMEDIÁRIA DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DO LH PLASMÁTICO

Correlacionando o grau de intensidade dos REc das células da camada intermediária com as dosagens de LH plasmático (mUI/ml) não foi encontrada significância estatística.

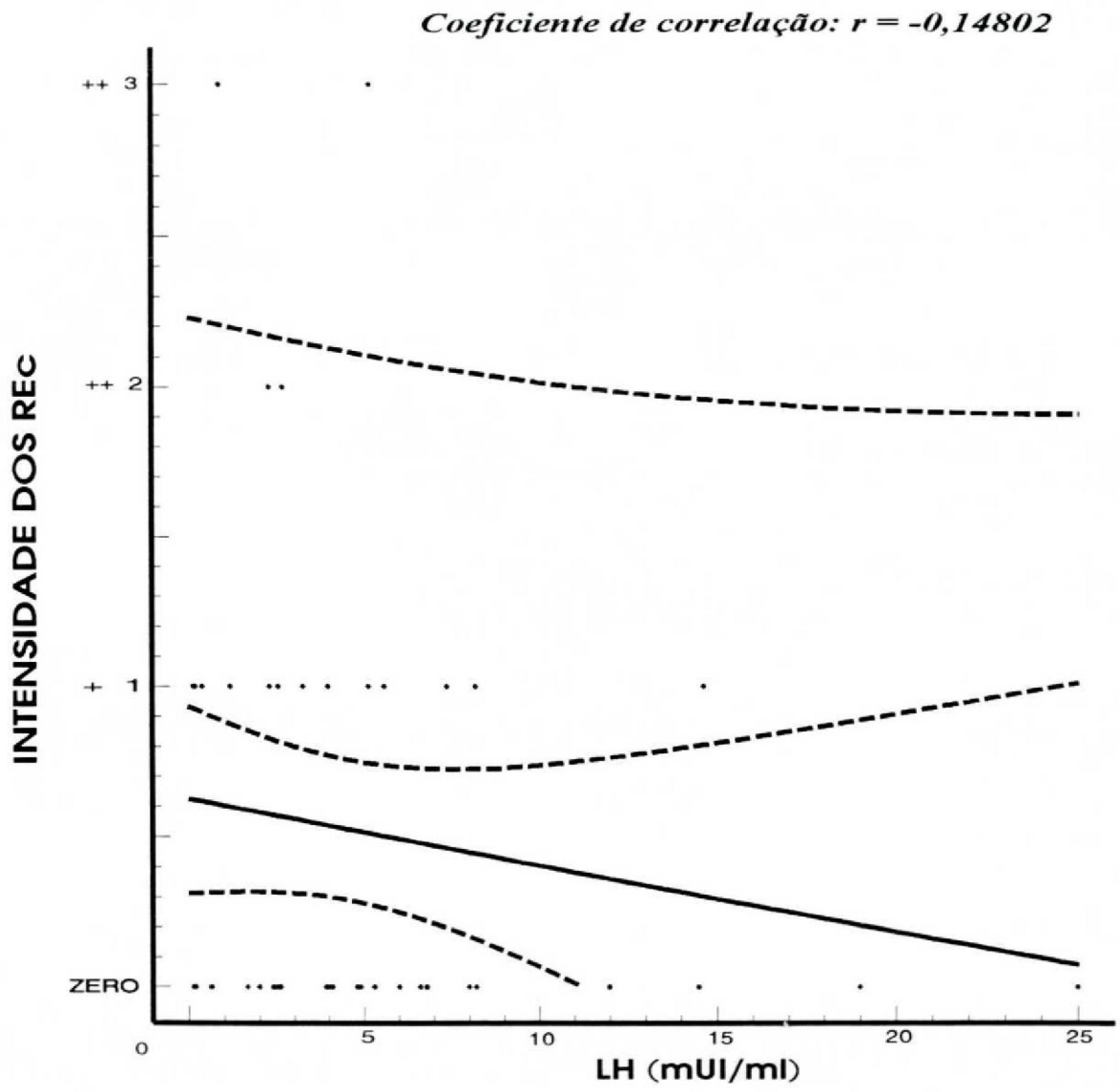


FIGURA 20 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA SUPERFICIAL DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DO LH PLASMÁTICO

A correlação entre as dosagens de LH plasmático (mUI/ml) e o grau de intensidade dos REc das células da camada superficial é negativa.

Quando se cotejaram os valores plasmáticos da prolactina e se buscou uma correlação com o grau de intensidade dos REc das células das três camadas do epitélio vaginal, os coeficientes mostraram correlações negativas (figuras 21, 22 e 23)

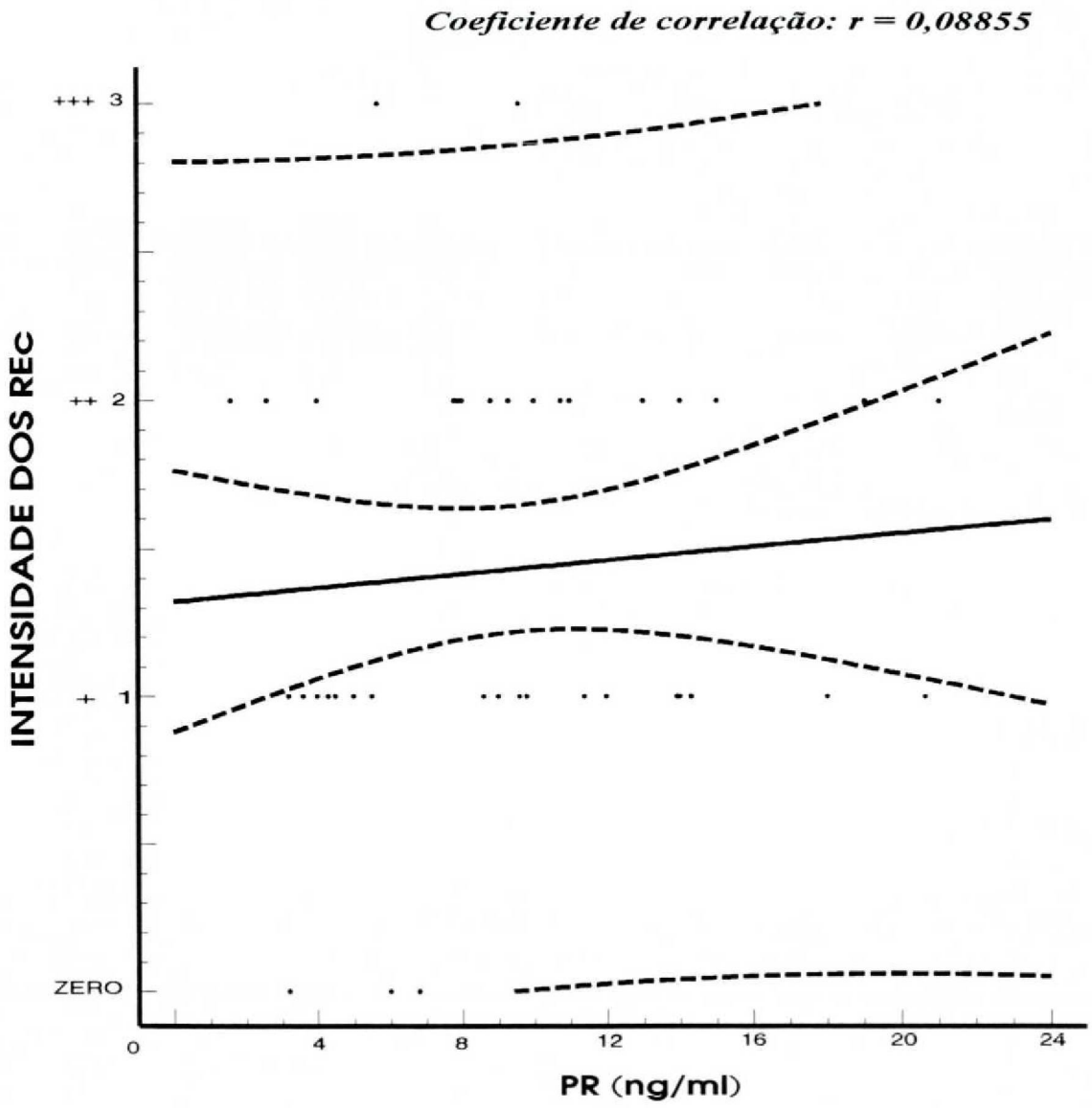


FIGURA 21 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA PROFUNDA DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DA PR PLASMÁTICO

A correlação entre as dosagens de PR plasmático (ng/ml) e o grau de intensidade dos REc das células da camada profunda não foi estatisticamente significativo.

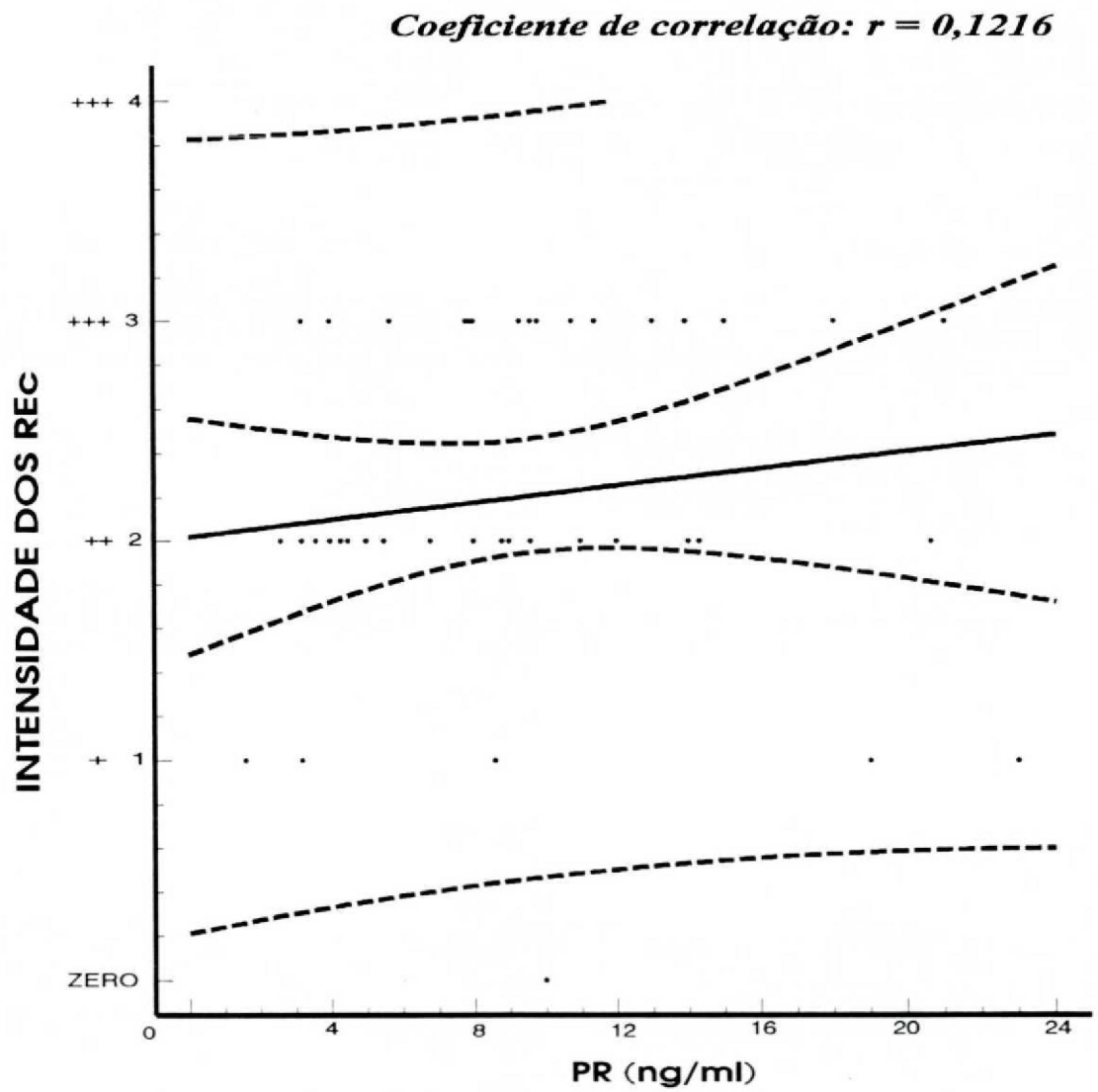


FIGURA 22 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA INTERMEDIÁRIA DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DA PR PLASMÁTICO

A correlação entre as dosagens de PR plasmático (ng/ml) e o grau de intensidade dos REc das células da camada intermediária não foi estatisticamente significativo.

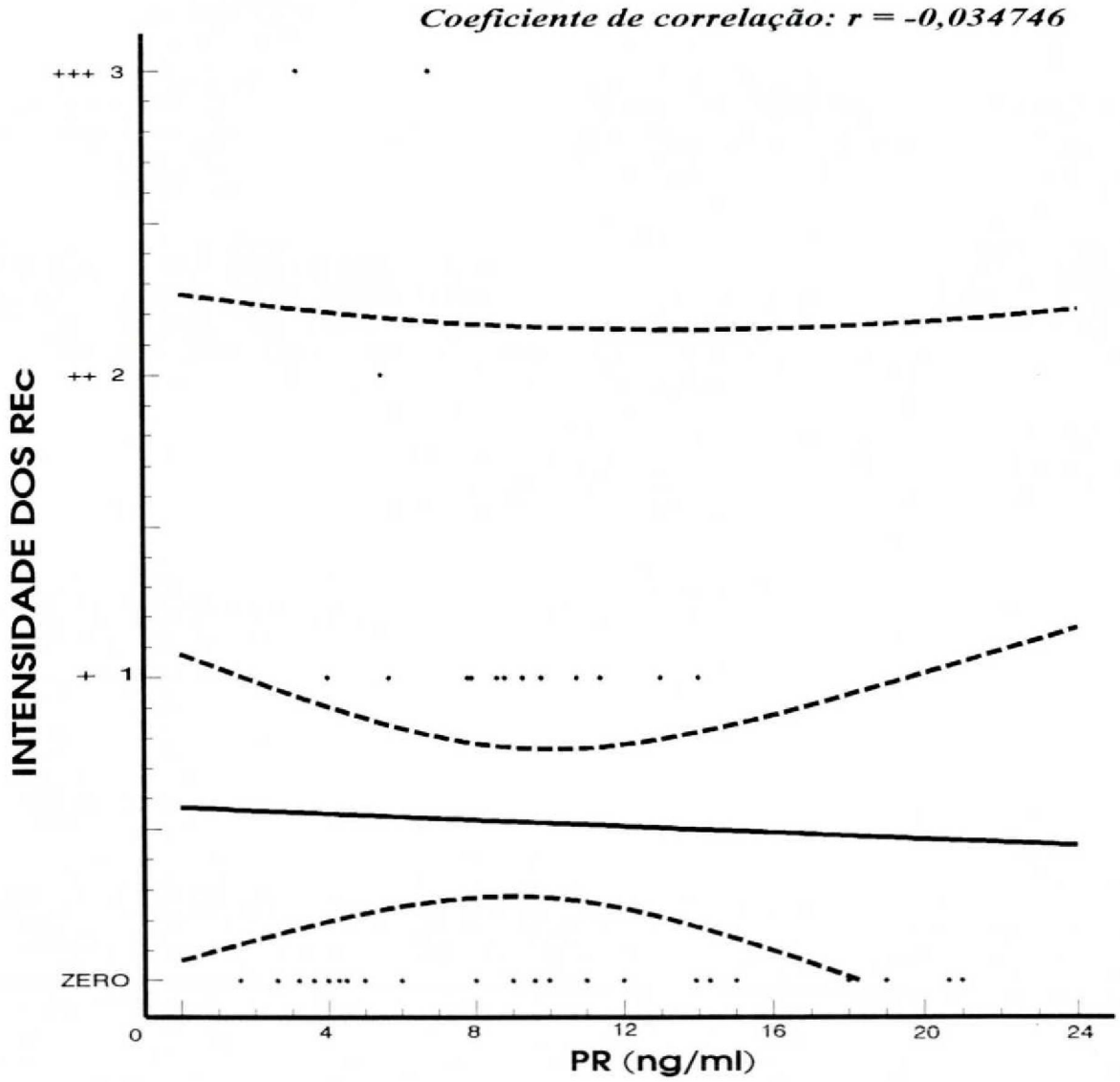


FIGURA 23 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA SUPERFICIAL DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DA PR PLASMÁTICO

Correlacionando o grau de intensidade dos REc das células da camada superficial com as dosagens de PR plasmático (ng/ml), não foi obtido resultado estatisticamente significativo.

A relação entre o grau de intensidade dos RE citoplasmáticos identificados nas células do epitélio vaginal e os valores de estradiol encontrados no plasma das pacientes incluídas neste estudo não apresentam uma correlação estatisticamente significativa (figuras 24, 25, e 26).

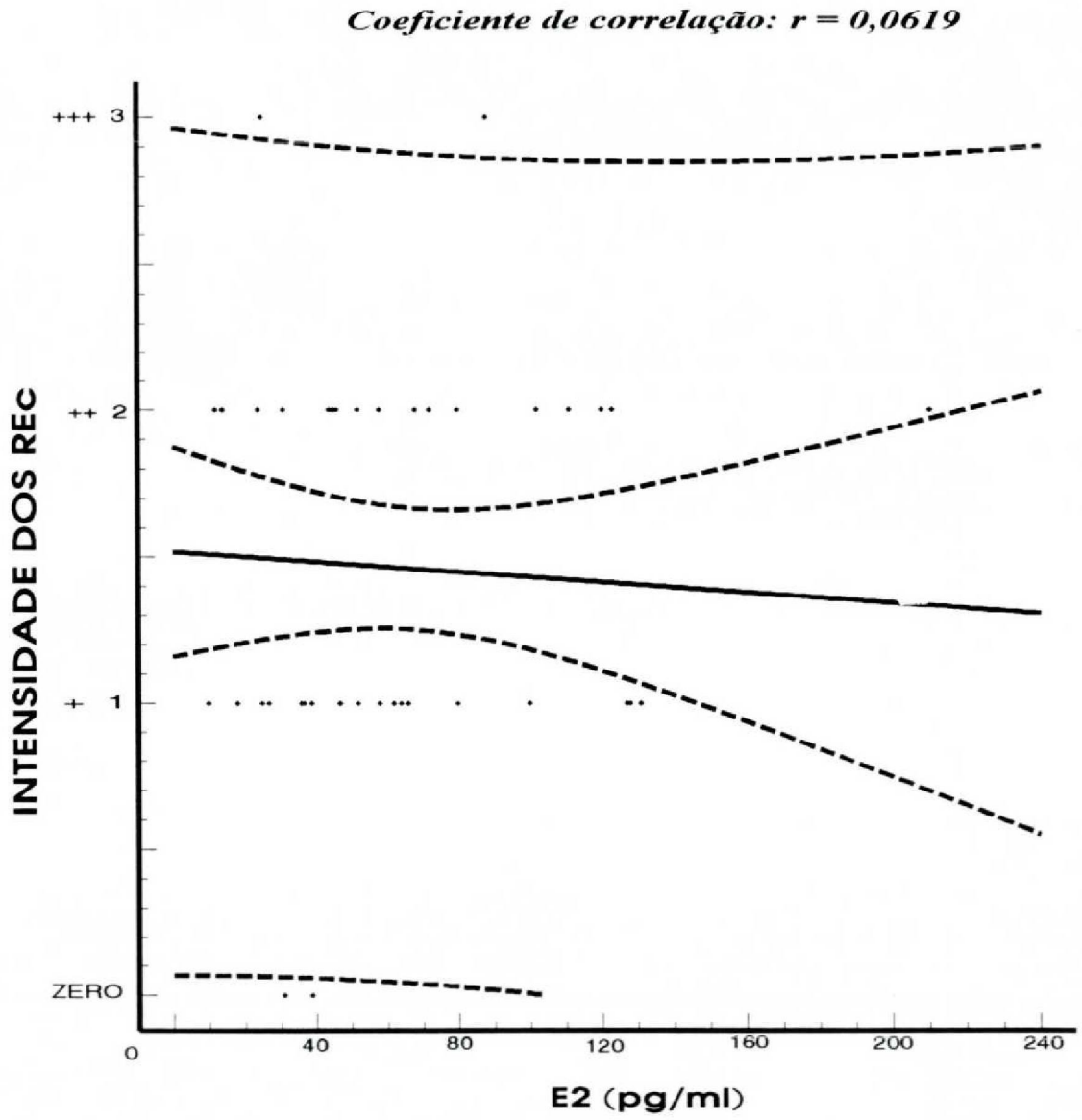


FIGURA 24 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA PROFUNDA DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DO E2 PLASMÁTICO

Correlacionando o grau de intensidade dos REc das células da camada profunda com as dosagens de E2 plasmático (pg/ml), não foi obtido resultado estatisticamente significativo.

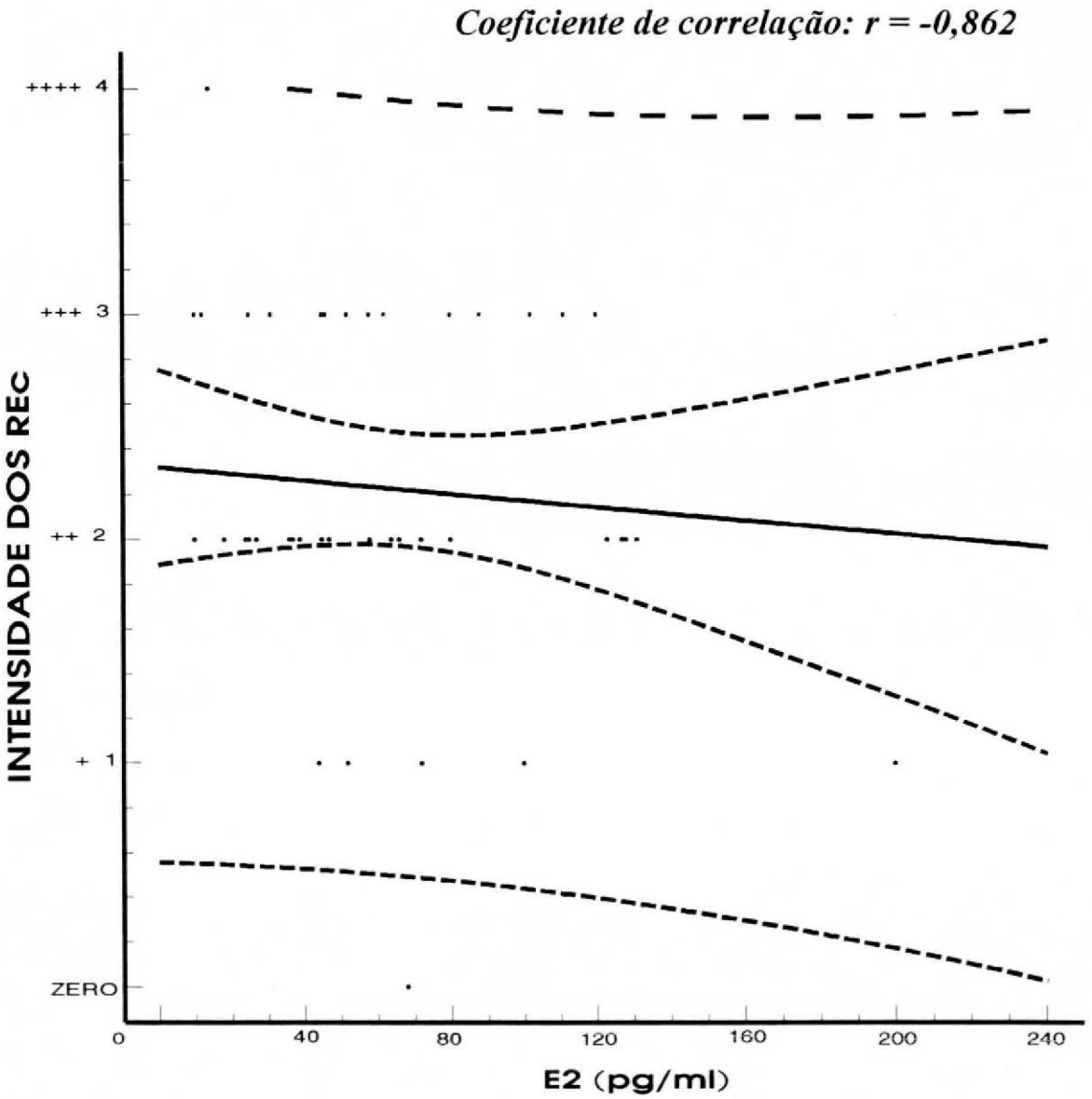


FIGURA 25 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA INTERMEDIÁRIA DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DO E2 PLASMÁTICO

Correlacionando o grau de intensidade dos REc das células da camada intermediária com as dosagens de E2 plasmático (pg/ml), não foi obtido resultado estatisticamente significativo.

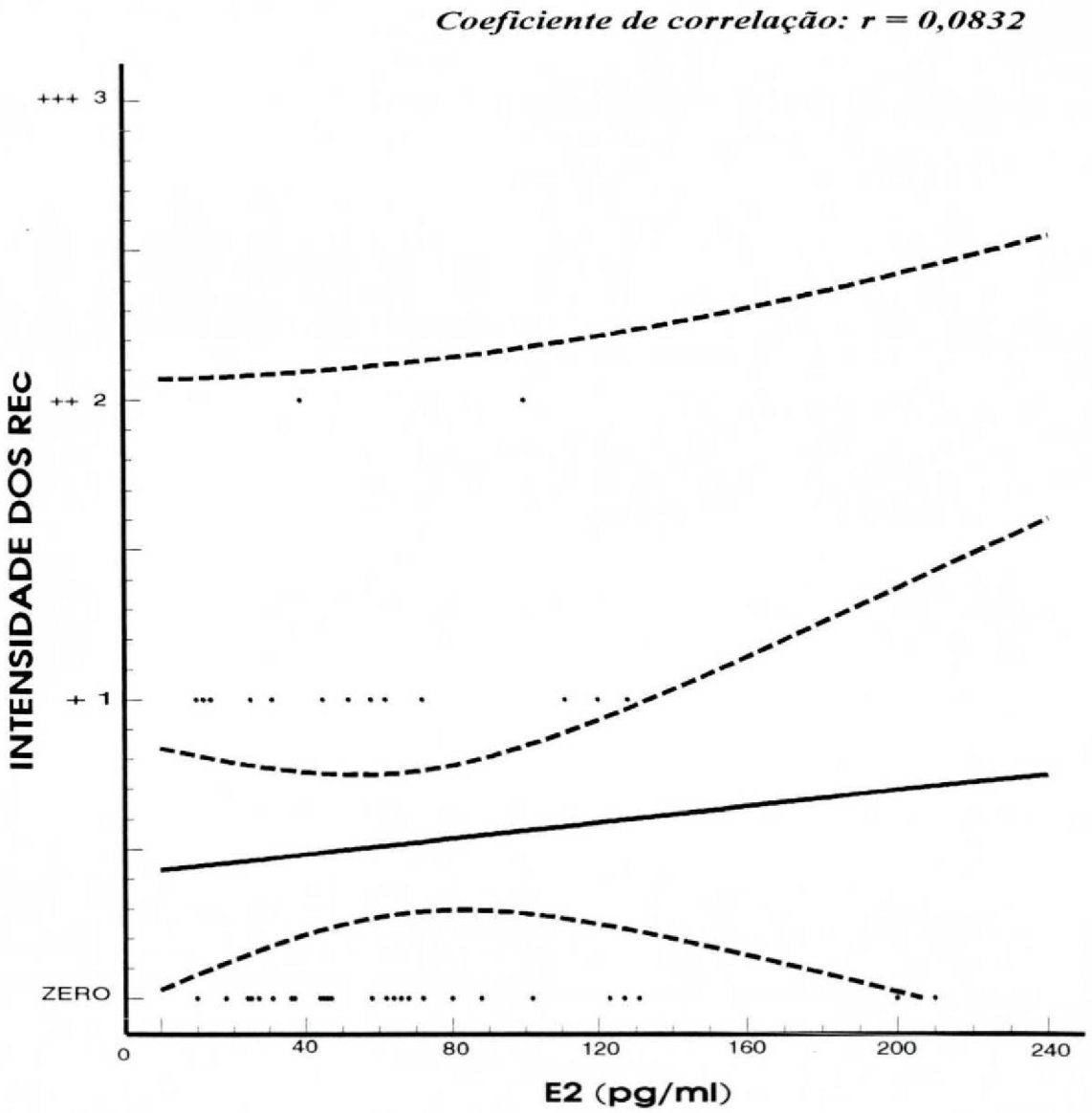


FIGURA 26 - CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE INTENSIDADE DOS REc DA CAMADA SUPERFICIAL DA MUCOSA VAGINAL E OS VALORES DO E2 PLASMÁTICO

A correlação entre as dosagens de E2 plasmático (pg/ml) e o grau de intensidade dos REc das células da camada superficial é negativa.

Quando se estudaram os modelos estatísticos que analisaram as relações entre os valores plasmáticos das dosagens hormonais de FSH, LH, PR e E2 e o grau de intensidade dos RE citoplasmáticos das células da camada intermediária, observa-se que existe uma tendência dos pontos representativos das variáveis analisadas em cada uma das pacientes concentrarem-se próximos às duas linhas de correlação positivas (figuras 16, 19, 22 e 25).

6 CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DOS RE CITOPLASMÁTICOS NAS DIFERENTES CAMADAS DO EPITÉLIO VAGINAL E OS ÍNDICES DE MATURAÇÃO DA CITOLOGIA ESFOLIATIVA VAGINAL

Para estabelecer a correlação entre a intensidade dos REc observados nas três camadas do epitélio vaginal e os índices de maturação (IM) da citologia vaginal, reunimos as pacientes em três grupos.

No grupo A foram reunidas as pacientes com índices de maturação 0/20/80; 0/30/70 e 0/40/60, isto é, citologia hormonal compatível com a predominância das células da camada superficial.

As mulheres cuja citologia vaginal traduzia um equilíbrio entre as células da camada superficial e intermediária foram incluídas no grupo B (IM: 0/50/50; 0/60/40 e 0/70/30).

Quando se observou o predomínio das células da camada intermediária do epitélio vaginal (IM: 0/80/20; 0/90/10 e 0/95/05), agrupamos as pacientes no grupo C.

Os REc de intensidade zero ou discreta foram tabulados e correlacionados com cada um dos IM agrupados.

Estabeleceu-se também a correlação entre a intensidade de REc moderada, forte e acentuada com cada um dos grupos de IM.

6.1 CAMADA PROFUNDA

Analisando a correlação entre os índices de maturação da citologia vaginal nas 40 pacientes incluídas nos grupos A, B e C e a intensidade dos REc não encontramos valores estatisticamente significativos, p = 0,707 (tabela XVIII), no teste exato de Fisher.

TABELA XVIII - CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA PROFUNDA DO EPITÉLIO VAGINAL E OS ÍNDICES DE MATURAÇÃO (IM) DA CITOLOGIA ESFOLIATIVA VAGINAL

ÍNDICES DE MATURAÇÃO AGRUPADOS (IM)		INTENSIDADE DOS REc		TOTAL DE MULHERES
		0 e +	++, +++ e ++++	
GRUPO A	0 / 20 / 80 0 / 30 / 70 0 / 40 / 60	04	03	07
GRUPO B	0 / 50 / 50 0 / 60 / 40 0 / 70 / 30	09	04	13
GRUPO C	0 / 80 / 20 0 / 90 / 10 0 / 95 / 5	11	09	20
TOTAL DE PACIENTES		24	16	40

p = 0,707

6.2 CAMADA INTERMEDIÁRIA

Pelo teste exato de Fisher, não se encontrou correlação estatisticamente significativa (p=0,304) entre a intensidade dos REc das células da camada intermediária do epitélio vaginal e os três grupos que expressam os índices de maturação da citologia esfoliativa vaginal (tabela XIX).

TABELA XIX - CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA INTERMEDIÁRIA DO EPITÉLIO VAGINAL E OS ÍNDICES DE MATURAÇÃO (IM) DA CITOLOGIA ESFOLIATIVA VAGINAL

ÍNDICES DE MATURAÇÃO AGRUPADOS (IM)		INTENSIDADE DOS REc		TOTAL DE MULHERES
		0 e +	++, +++ e ++++	
GRUPO A	0 / 20 / 80 0 / 30 / 70 0 / 40 / 60	01	06	07
GRUPO B	0 / 50 / 50 0 / 60 / 40 0 / 70 / 30	03	10	13
GRUPO C	0 / 80 / 20 0 / 90 / 10 0 / 95 / 5	01	19	20
TOTAL DE PACIENTES		05	35	40

p = 0,304

6.3 CAMADA SUPERFICIAL

Na tabela XX avaliamos a correlação entre os grupos A, B e C da citologia esfoliativa vaginal (IM agrupados) e a intensidade dos REc das células da camada superficial do epitélio vaginal.

Não existe correlação estatisticamente significativa entre a intensidade dos REc das células da camada superficial do epitélio vaginal e os índices de maturação agrupados. No teste exato de Fisher encontramos p = 0,572.

TABELA XX - CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA SUPERFICIAL DO EPITÉLIO VAGINAL E OS ÍNDICES DE MATURAÇÃO (IM) DA CITOLOGIA ESFOLIATIVA VAGINAL

ÍNDICES DE MATURAÇÃO AGRUPADOS (IM)		INTENSIDADE DOS REc		TOTAL DE MULHERES
		0 e +	++, +++ e ++++	
GRUPO A	0 / 20 / 80 0 / 30 / 70 0 / 40 / 60	06	01	07
GRUPO B	0 / 50 / 50 0 / 60 / 40 0 / 70 / 30	11	02	13
GRUPO C	0 / 80 / 20 0 / 90 / 10 0 / 95 / 5	19	01	20
TOTAL DE PACIENTES		36	04	40

p = 0,572

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Simplificando a complexidade dos fenômenos biológicos que regem os mecanismos neuroendócrinos que regulam e desencadeiam a fisiologia do aparelho genital feminino, admite-se uma harmonia entre a magnitude da causa e a quantidade da resposta. Nos fenômenos biológicos, temos que admitir, de um lado, uma relação causa-efeito, isto é, um condicionante que desencadeia ou modifica o fenômeno e, por outro lado, um predisponente que participe ou intervenha na maneira com que o organismo responde a este estímulo.

Deste modo, uma substância circulante no organismo, mesmo que em pequena quantidade, pode determinar uma resposta de grande magnitude, desde que ocorra a intervenção e a participação das condições predisponentes. Se estas condições não existirem ou forem adversas, a resposta poderá ser ínfima, ou faltar por completo.

À medida que a complexidade orgânica aumenta e que os organismos pluricelulares aperfeiçoam-se, novas e complexas substâncias atuam, condicionando ou predispondo fenômenos biológicos. Estas substâncias são os biocatalizadores, destinados a dirigir o metabolismo das células e a regular os processos intracelulares, como as enzimas por exemplo; ou a agir à distância sobre determinado órgão, como por exemplo os hormônios e os neurotransmissores; ou substâncias que regulam determinados conjuntos bioquímicos, como as vitaminas.

JENSEN e JACOBSON (1962), utilizando hormônio marcado com átomos radioativos, verificaram que as células que respondem ao hormônio estradiol têm a capacidade de acumulá-lo e retê-lo por algumas horas, ao passo que, células de tecidos que não respondem a este hormônio, o eliminam rapidamente. Quando TOFT e GORSKI (1966) detectaram uma

molécula receptora de estradiol, iniciou-se um período importante de descobertas que ajudaram a compreender e a explicar mecanismos endócrinos.

A proteína receptora, denominada receptor hormonal, foi identificada nos tecidos-alvo de todos os esteróides conhecidos, estando ausente nos tecidos não-alvo. Estas proteínas receptoras interagem com as moléculas dos hormônios no citoplasma das células-alvo, e este complexo hormônio-proteína receptora dirige-se para o núcleo, onde vai ligar-se a seqüências específicas de DNA denominados elementos de resposta ao esteróide (SRE). Os elementos de resposta ao esteróide atuam a nível da transcrição gênica, determinando o aumento dos sítios de iniciação de síntese dos RNA mensageiro (SPEROFF, 1975; AMABIS, 1981; COOKE, 1988; CLARK, 1992; PARKER, 1993).

A ligação do hormônio ao respectivo receptor é forte, reversível e altamente específica. A presença de proteínas imunorreativas específicas presentes no citoplasma permite o emprego de reações imunocitoquímicas para identificar e caracterizar substâncias antigênicas nos tecidos. Graças à imunorreatividade aos anti-soros específicos, identificaram-se receptores estrogênicos citoplasmáticos em cortes histológicos oriundos de biópsias vaginais.

A vagina, sendo um órgão afetado pelos níveis dos estrogênios circulantes, é de se esperar que possua receptores específicos para os estrogênios. Estudos de VAN HAAFTEN et al. (1982) evidenciaram na mucosa vaginal a presença dos receptores estrogênicos citoplasmáticos e MAC LEAN et al. (1990) também demonstraram a presença dos RE no epitélio vaginal em mulheres pós-menopausa.

A ligação do estrogênio a uma proteína citoplasmática, formando um complexo hormônio-receptor, foi comprovado nas células do epitélio vaginal de quarenta e seis mulheres que estavam no menacme. No grupo estudado, não foram observados receptores estrogênicos citoplasmáticos nas células do epitélio vaginal de três pacientes.

A vagina recoberta por um epitélio plano poliestratificado pavimentoso está sujeita à ação de hormônios, sobretudo dos estrogênios. O efeito dos estrogênios sobre a vagina é uma das ações mais estudadas deste grupo endócrino, pelas quais não só os métodos de avaliação

biológica do hormônio do estro se baseiam, como também pelas características das células desagregadas ciclicamente.

Desta forma, a presente pesquisa encontrou nas observações imunocitoquímicas de biópsias da mucosa vaginal um excelente meio para investigar a presença de receptores estrogênicos citoplasmáticos.

WOLF et al. (1991), comparando os achados dos RE encontrados em tecido vaginal e em epitélio urinário, sugerem maior sensibilidade da mucosa vaginal, evidenciando nesta, níveis mais elevados de receptores citoplasmáticos de estrogênio.

A biologia da reprodução das mulheres caracteriza-se por uma ciclicidade periódica, quer durante o período de um ciclo menstrual, quer durante as sucessivas etapas biológicas que a mulher percorre em sua vida.

Considerando-se estas variáveis, analisamos o perfil endócrino das pacientes através das dosagens plasmáticas de FSH, LH, PR e E2 circulantes. Os valores encontrados foram compatíveis com os níveis considerados normais para mulheres no menacme. A mucosa vaginal, bastante sensível à ação dos hormônios ovarianos, prolifera sob a ação estrogênica. O glicogênio depositado na camada intermediária aumenta. No exsudato vaginal das mulheres observa-se uma maior percentagem das células das camadas superficiais. Na vagina de animais, especialmente roedores, o fenômeno de proliferação induzido pelos estrogênios e de desagregação posterior alcança grandes proporções. As diferentes camadas do epitélio vaginal são esquematicamente divididas: profunda ou basal, intermediária e superficial e sofrem variações nítidas durante o ciclo ovariano normal.

As observações das células esfoliadas, através da colpocitologia funcional realizadas em esfregaços vaginais coletados no grupo de mulheres incluídas neste experimento, serviram como método propedêutico para confirmar que as pacientes estudadas apresentavam variações fisiológicas compatíveis com a faixa etária e com as fases do ciclo menstrual.

Para a investigação dos receptores estrogênicos citoplasmáticos em biópsias da mucosa vaginal, mereceu atenção especial o local onde se deveria praticar a biópsia, já que a vagina

não responde à estimulação hormonal de forma exatamente uniforme. Cada área da mucosa vaginal mantém um ritmo próprio de resposta, como efetor (LENCIONI, 1962).

A padronização da região onde foi realizada a biópsia da mucosa vaginal para a coleta de tecido epitelial e onde se fez o raspado das paredes vaginais para o estudo da citologia funcional foi cuidadosamente seguida. A parede ântero-lateral do terço médio da mucosa vaginal foi o local de escolha.

Os preparados histológicos evidenciaram diversas camadas de células com características próprias, que foram descritas esquematicamente, do ponto de vista celular, como células das camadas profunda, intermediária e superficial (PUNDEL, 1952).

Na tabela IX mostramos as observações citológicas, cujas células esfoliativas foram obtidas em raspados que procediam da mesma região onde foi coletada a biópsia, o que facilita a compreensão das observações.

Avaliando a intensidade dos REc nas células da camada profunda do epitélio vaginal, observamos que as granulações citoplasmáticas, evidenciadas pela reação imunocitoquímica específica para o estrogênio, tinham intensidade discreta e moderada. A análise estatística demonstrou que as variações de intensidade de RE citoplasmáticos, encontrados nos cortes histológicos do epitélio vaginal, não sofrem a influência das variações neuroendócrinas e fisiológicas ocorridas durante o ciclo menstrual.

WIEGERINCK et al. (1980) e DICARLO et al. (1985), em estudos procedidos também em epitélio vaginal de mulheres no menacme, não obtiveram valores estatisticamente significativos e distintos nas diferentes fases do ciclo menstrual.

Na avaliação de SJÖBERG et al. (1989) através da quantificação dos RE no epitélio vaginal durante o ciclo menstrual, não foi encontrado diminuição dos REc na fase luteínica.

Resultados diferentes obtiveram GOULD et al. (1983) e PRESS et al. (1986). Suas observações em fragmentos de epitélio vaginal mostraram que a intensidade dos RE nucleares sofre distintas mudanças durante o ciclo menstrual.

A correlação entre os diferentes valores plasmáticos dos hormônios FSH, LH, PR e E2 e os graus de intensidade dos RE citoplasmáticos é negativa, o que sugere que as células da camada profunda são pouco estimuladas pelos hormônios estrogênicos.

Cotejando os achados das leituras de cortes histológicos de tecido vaginal tratados por técnica imunocitoquímica específica, encontramos maior intensidade de receptores de estrogênio citoplasmático nas células da camada intermediária, independente da fase do ciclo menstrual das pacientes. Em duas mulheres os REc estavam ausentes.

Tabulando-se os diferentes valores encontrados nas dosagens plasmáticas de FSH, LH, PR e E2 com os graus de intensidade dos REc das células da camada intermediária do epitélio vaginal, verifica-se que, em um grande número de pacientes, os valores das dosagens hormonais plasmáticas estão correlacionados ao grau de intensidade dos RE citoplasmáticos. Estas células ricas em glicogênio e em mucopolissacarídeos participam intensamente da resposta efetora da vagina.

As células superficiais do epitélio vaginal, bastante sensíveis à estimulação estrogênica, são muito pobres em glicogênio, apresentam alterações nucleares típicas e participam intensamente dos processos esfoliativos cíclicos. Essas células apresentam um maior número de RE citoplasmáticos ausentes. A ausência destes receptores citoplasmáticos para os estrogênios ocorre nas duas fases do ciclo menstrual e naquelas mulheres em que os REc estavam presentes a sua intensidade foi evidenciada como fraca.

Correlacionando, através de uma tabulação cruzada, os níveis de intensidade dos RE citoplasmáticos encontrados na camada profunda e na camada superficial dos cortes histológicos do epitélio vaginal não se encontrou correlação. Entretanto, quando se comparou a intensidade dos REc das células da camada intermediária com as células da camada profunda dos preparados histológicos do epitélio vaginal estabeleceu-se uma correlação positiva a nível de probabilidade de $p = 0,059$. As células da camada intermediária do epitélio vaginal, têm maior intensidade dos RE citoplasmáticos do que as células superficiais da mucosa vaginal.

No estudo, já referido anteriormente, WIEGERINCK et al. (1980) também não encontraram correlação entre os níveis de RE e os níveis hormonais plasmáticos de FSH, LH, estradiol e estrona.

O organismo feminino apresenta períodos marcantes e bem delimitados no transcurso das sucessivas etapas biológicas que a mulher percorre durante sua vida. Cada um dos períodos marcados por transformações fisiológicas e morfológicas características é acompanhado e regulado por variações neuroendócrinas próprias.

No menacme, período reprodutivo da mulher, estas alterações são típicas, ocorrendo em condições normais os ciclos menstruais ovulatórios e os ciclos grávido-puerperais, cada um com perfis endócrinos e alterações fisiológicas próprias.

O período de maturidade sexual é demarcado por dois fenômenos fundamentais: a menarca e a menopausa. Assim considerando, a fase pós-puberal, como a pré-menopausal fazem parte do menacme. Como em cada uma destas etapas biológicas ocorrem variações do perfil endócrino, investigou-se o que se passava com a intensidade dos RE citoplasmáticos das células vaginais em diferentes grupos etários.

As células da camada intermediária do epitélio vaginal apresentaram maior intensidade de RE citoplasmáticos nas pacientes com idade superior a 26 anos. Quando comparadas com pacientes com idade entre 11 e 25 anos a diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,03991$).

Comparando a intensidade de REc identificados em células de cortes histológicos da camada intermediária do epitélio vaginal de pacientes entre 11 e 15 anos com a intensidade de REc de células da camada intermediária da mucosa vaginal de mulheres com idade entre 40 e 45 anos (fase pré-menopausa) encontramos diferença estatisticamente significativa a um nível de probabilidade de $p = 0,06$. Daí conclui-se que pacientes com maior idade apresentaram maior intensidade de RE citoplasmáticos.

Os resultados, obtidos por diversos autores, correlacionando o achado de RE em preparados histológicos da vagina, com a idade das pacientes, são variáveis. WIERGERINCK et al. (1980) não encontraram correlação entre os níveis de receptores e os grupos etários das

pacientes. GOULD et al. (1983), estudando a presença dos RE nucleares em biópsias de epitélio vaginal de mulheres na pós-menopausa, determinaram que seus níveis eram mais elevados do que no menacme. DI CARLO et al. (1985) evidenciaram que o epitélio vaginal não tem variações na intensidade dos RE nem em diferentes fases do ciclo menstrual, nem nas fases pré ou pós-menopausa.

A vagina, como órgão efetor de estrogênio, permite o estudo do padrão de atividade estrogênica, em especial da ligação do hormônio ao receptor citoplasmático, formando o complexo hormônio-receptor. O aparecimento de uma resposta funcional específica no tecido-alvo originada na ação de proteínas novas sintetizadas nos REc; o transporte do complexo para o núcleo; a indução da atividade gênica, resultando no aparecimento de novas espécies de RNA; e o transporte do RNA para o citoplasma resultando na síntese de novas proteínas (AMABIS, 1981), dão importância especial ao tema estudado.

Esta variabilidade da resposta do epitélio vaginal pode torná-lo sensível a inúmeros agentes infecciosos como o HPV (*human papiloma virus*), por exemplo.

SJÖBERG et al. (1989) e GIOCCA et al. (1992) observaram que, durante a segunda fase do ciclo menstrual, o epitélio vaginal está mais fino e a proliferação da camada basal é menor, possivelmente condicionada pela queda dos níveis de intensidade dos RE e pela presença dos receptores de progesterona. Estas pesquisas sugerem que os diferentes níveis de RE do epitélio vaginal determinadas por variações do perfil endócrino passam a ter grande importância durante a terapêutica hormonal com hormônios anticoncepcionais. A carga hormonal exógena, determinando variações nos níveis hormonais plasmáticos, poderá induzir alterações funcionais do epitélio vaginal o que facilita a instalação de processos infecciosos.

A evolução das pesquisas sobre RE citoplasmáticos e RE nucleares, procurando esclarecer a atividade hormonal nos diferentes órgãos e tecidos, permitirá adequar a terapêutica hormonal às reais necessidades do organismo, poderá tratar patologias que por alterações metabólicas celulares alterem os níveis hormonais e poderá compreender melhor a fisiologia da mulher em todas as suas etapas biológicas.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1) Os receptores estrogênicos citoplasmáticos avaliados por teste imunocitoquímico são encontrados em cortes histológicos do epitélio vaginal de mulheres no menacme.

2) Pela técnica imunocitoquímica específica (PAP), observam-se diferentes colorações dos preparados histológicos conforme a intensidade dos receptores estrogênicos presentes no citoplasma destas células.

3) As diferentes colorações dos cortes histológicos submetidos a reações imunocitoquímicas específicas (PAP) permitem sugerir uma sistematização para a interpretação do grau de intensidade dos receptores estrogênicos citoplasmáticos, partindo do zero quando ausentes, passando à coloração amarelo-clara quando a intensidade é discreta (+), coloração amarelada quando a intensidade dos REc é moderada (++), coloração alaranjada quando a intensidade dos REc é forte (+++) e coloração avermelhada quando a intensidade dos REc for acentuada (++++).

4) A intensidade dos RE citoplasmáticos nas células do epitélio vaginal variam em cada uma das três camadas do epitélio vaginal. Na camada profunda, há um predomínio das intensidades discreta (+) e moderada (++); na camada intermediária, esta intensidade dos REc é moderada (++) e forte (+++) com maior freqüência; e na camada superficial, 57,1% das mulheres não apresentam RE citoplasmáticos

(ausentes - zero) e 28,6% mostraram REc de discreta intensidade nos cortes histológicos (+).

5) As células da camada intermediária do epitélio vaginal têm maior intensidade dos receptores estrogênicos citoplasmáticos do que as células superficiais.

6) As diferenças entre a intensidade dos RE citoplasmáticos das células da camada intermediária e das células da camada profunda de cortes histológicos do epitélio vaginal de mulheres no menacme é estatisticamente positiva.

7) As diferenças de intensidade dos RE citoplasmáticos, encontrados nas células do epitélio vaginal das biópsias coletadas nas duas fases do ciclo menstrual, não evidenciam diferenças estatisticamente significativas. A presença dos REc nas células da camada intermediária do epitélio vaginal não dependem da fase do ciclo menstrual.

8) Não se encontrou correlação estatisticamente significativa entre os valores plasmáticos das dosagens hormonais de FSH, LH, PR e E2 e o grau de intensidade dos RE citoplasmáticos encontrados em células da camada profunda e superficial dos cortes histológicos da mucosa vaginal. Na camada intermediária, a correlação aproxima-se do intervalo de confiança da linha de regressão, porém sem significado estatístico.

9) Há variações da intensidade dos RE citoplasmáticos das células da camada intermediária do epitélio vaginal, conforme a faixa etária das mulheres. As pacientes com idade superior a 26 anos apresentam maior intensidade dos RE citoplasmáticos nesta camada.

10) As mulheres do grupo etário de 40 a 45 anos, isto é, no final da vida reprodutiva, apresentam maior intensidade de RE citoplasmáticos nos cortes histológicos do epitélio vaginal do que as pacientes jovens e com idade entre 11 e 15 anos.

11) Não há correlação estatisticamente significativa entre os índices de maturação da citologia esfoliativa vaginal e a intensidade dos receptores de estrogênio citoplasmáticos das células desagregadas do epitélio vaginal.

12) As células das diferentes estruturas do epitélio vaginal de mulheres no menacme permitem identificar e valorizar os receptores estrogênicos citoplasmáticos nas diferentes fases do ciclo biológico da mulher, desde que individualizadas cada uma das camadas celulares que a compõem (CP, CI e CS) e considerada a faixa etária.

ANEXOS

ANEXO I - INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA PROFUNDA DO EPITÉLIO VAGINAL CORRELACIONADAS COM AS FASES DO CICLO MENSTRUAL

PRESENÇA DE REc INTENSIDADE	FASES DO CICLO			TOTAL DE
CAMADA PROFUNDA	NÃO DETERMINADOS	1ª	2ª	MULHERES
ZERO (AUSENTE)	00	00	03	03
%	0	0	17,6	6,1
+	01	11	09	21
%	50,0	36,7	52,9	42,9
++	01	14	05	20
%	50,0	46,6	29,5	40,8
+++	00	02	00	02
%	0	6,7	0	4,1
NÃO DETERMINADO	00	03	00	03
	0	10,0	0	6,1
TOTAL DE PACIENTES	02	30	17	49
PERCENTAGEM	4,1	61,2	34,7	100,0

ANEXO II - CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA INTERMEDIÁRIA DO EPITÉLIO VAGINAL E AS FASES DO CICLO MENSTRUAL

PRESENÇA DE REc INTENSIDADE CAMADA INTERMEDIÁRIA	FASES DO CICLO			TOTAL DE MULHERES
	NÃO DETERMINADOS	1ª	2ª	
ZERO (AUSENTE)	00	01	01	02
%	0	3,3	5,9	4,1
+	00	04	01	05
%	0	13,3	5,9	10,2
++	01	09	11	21
%	50,0	30,0	64,7	42,9
+++	01	12	04	17
%	50,0	40,0	23,5	34,7
++++	00	01	00	01
	0	3,3	0	2,0
NÃO DETERMINADO	00	03	00	03
%	0	10,0	0	6,1
TOTAL DE PACIENTES	02	30	17	49
PERCENTAGEM	4,1	61,2	34,7	100,0

ANEXO III - CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA SUPERFICIAL DO EPITÉLIO DA VAGINA COM AS FASES DO CICLO MENSTRUAL.

PRESENÇA DE REc INTENSIDADE CAMADA SUPERFICIAL	FASES DO CICLO			TOTAL DE MULHERES
	NÃO DETERMINADOS	1ª	2ª	
ZERO (AUSENTE)	01	14	13	28
%	50,0	46,7	76,5	57,1
+	01	11	02	14
%	50,0	36,7	11,8	28,6
++	00	02	00	02
%	0	6,7	0	4,1
+++	00	00	02	02
%	0	0	11,8	4,1
NÃO DETERMINADO	00	03	00	03
%	0	10,0	0	6,1
TOTAL DE PACIENTES	02	30	17	49
PERCENTAGEM	4,1	61,2	34,7	100,0

ANEXO IV - INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA PROFUNDA DO EPITÉLIO VAGINAL EM DIFERENTES GRUPOS ETÁRIOS

INTENSIDADE DE REc	GRUPOS ETÁRIOS		TOTAL DE MULHERES
CAMADA PROFUNDA	GRUPO A 11 a 25 anos	GRUPO B 26 a 45 anos	
ZERO (AUSENTE)	01	02	03
%	6,3	6,1	6,1
+	06	15	21
%	37,5	45,5	42,9
++	08	12	20
%	50,0	36,4	40,8
+++	01	01	02
%	6,3	3,0	4,1
NÃO DETERMINADO	00	03	03
%	0	9,1	6,1
TOTAL DE PACIENTES	16	33	49
PERCENTAGEM	32,7	67,3	100,0

ANEXO V - INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA INTERMEDIÁRIA DO EPITÉLIO DA VAGINA EM DIFERENTES GRUPOS ETÁRIOS

INTENSIDADE DOS REc CAMADA INTERMEDIÁRIA	GRUPOS ETÁRIOS GRUPO A 11 a 25 anos	 GRUPO B 26 a 45 anos	TOTAL DE MULHERES
ZERO (AUSENTE)	01	01	02
%	6,3	3,0	4,1
+	00	05	05
%	0	15,2	10,2
++	05	16	21
%	31,3	48,5	42,9
+++	09	08	17
%	56,3	24,2	34,7
++++	01	00	01
%	6,3	0	2,0
NÃO DETERMINADO	00	03	03
%	0	9,1	6,1
TOTAL DE PACIENTES	16	33	49
PERCENTAGEM	32,7	67,3	100,0

ANEXO VI - INTENSIDADE DOS REc NA CAMADA SUPERFICIAL DO EPITÉLIO VAGINAL EM DIFERENTES GRUPOS ETÁRIOS

INTENSIDADE DE REc CAMADA SUPERFICIAL	GRUPOS ETÁRIOS GRUPO A 11 a 25 anos	 GRUPO B 26 a 45 anos	TOTAL DE MULHERES
ZERO (AUSENTE)	06	22	28
%	37,5	66,7	57,1
+	10	04	14
%	62,5	12,1	28,6
++	00	02	02
%	0	6,1	4,1
+++	00	02	02
%	0	6,1	4,1
NÃO DETERMINADO	00	03	03
%	0	9,1	6,1
TOTAL DE PACIENTES	16	33	49
PERCENTAGEM	32,7	67,3	100,0

ANEXO VII - INTENSIDADE DOS REc NOS SUBGRUPOS ETÁRIOS I E II - (EXTREMOS DA VIDA REPRODUTIVA)

CAMADAS DO EPITÉLIO VAGINAL	IDADE (anos)	INTENSIDADE DOS REc	
		0, + e ++	+++ e ++++
PROFUNDA	11 a 15 (Subgrupo I)	06	00
	40 a 45 (Subgrupo II)	09	01
INTERMEDIÁRIA	11 a 15 (Subgrupo I)	01	05
	40 a 45 (Subgrupo II)	07	03
SUPERFICIAL	11 a 15 (Subgrupo I)	06	00
	40 a 45 (Subgrupo II)	10	00

ANEXO VIII - PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS
(FICHA AUXILIAR)

Caso n°: _____ Registro HC: _____
Nome: _____ Sigla: _____

Menarca: _____ anos Estado Civil: _____
Ciclos Menstruais: Intervalo máximo: _____ dias
Intervalo mínimo: _____ dias
Última menstruação: ___/___/___ Data da colheita: ___/___/___

Exame Ginecológico:
Mamas: Telarca _____ anos
Grau de desenvolvimento mamário:
Tanner: _____
Galactorréia:_____
Vulva: Grandes lábios: _____
Pequenos lábios: _____ (aspecto trófico)
Introito vulva: _____
Vagina: Paredes vaginais: _____(se lisas ou rugosas)
Conteúdo: _____
Útero: Posição: _____
Dimensões: _____

Exames Laboratoriais:
Citologia vaginal: descritivo _____
Índice de Maturação: ___/___/___

Dosagens Hormonais:
FSH: _____ mUI/ml LH: _____ mUI/ml
Prolactina: _____ ng/ml Estradiol: _____ pg/ml

Receptores Hormonais (REc): Intensidade
Camada Profunda:_____
Camada Intermediária: _____
Camada Superficial: _____

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAMDAL, S.; BORMER, O.; JORGENSEN, O.; HOST, H.; ELIASSEN, G.; KAALHUS, O.; PIHL, A. Estrogen receptors and long term prognosis in breast cancer. **Cancer**, Philadelphia, v. 53, p. 2525-2529, 1984.

AMABIS, J. M.; MORGANTE, J. S.; SIMÕES, L. C. G. **Textos de genética**. v. 1. São Paulo : Universidade, 1981.

BATRA, S.; IOSIF, C. S.; SJOGREN, C. Effect of estradiol and estriol treatment vaginal estrogen receptors in the ovariectomized rabbit. **Gynecol Obstet Invest**, Basel, v. 17, p. 163-166, 1984.

_____. Effect of estrogen treatment on the peroxidase activity and estrogen receptor in the female rabbit urogenital tissues. **J Urol**, Baltimore, v. 148, n. 3, p. 935-938, 1992.

BATRA, S.; IOSIF, S. Progesterone receptors in human vaginal tissue. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 153, p. 524-528, 1985.

_____. Tissues specific effects of progesterone on progesterone en estrogen receptors in the female urogenital tract. **J Steroid Biochem**, Oxford, v. 32, p. 35, 1989.

BAYARD, F.; DAMILANO, S.; ROBEL, P.; BAULIEU, E. E. Cytoplasmic an nuclear estradiol and progesterone receptors in human endometrium. **J Clin Endocrinol Metab**, Baltimore, v. 46, p. 635-648, 1978.

BEATSON, G. T. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: sugestions for a new method of treatment with ilustrative cases. **Lancet**, London, v. ii, p. 104-107/162-165, 1896.

BRENNER, R. M.; WEST, N. B.; McCLELLAN, M. C. Estrogen and progestin receptors in the reprodutive tract of male and female primates. **Biol Reprod**, New York, v. 42, p. 11-19, 1990.

BRENTANI, M. M.; LOPES, M. T. P.; PEREYRA, E. G.; PACHECO, M. M. Receptores de estrógeno e progesterona em cervix uterina. **J Bras Ginec**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 9, p. 411-415, 1985.

CASTANEDA, E.; LIAO, S. The use of anti-steroid antibodies in the characterisation of steroid receptors. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 250, p. 823-902, 1975.

CHAN, L.; O'MALLEY, B. W. Mechanism of action of the sex steroid hormones. **N Engl J Med**, Boston, v. 294, p. 1322, 1976.

_____. Steroid hormone action : recent advances. **Ann Int Med**, Philadelphia, v. 89, p. 649-701, 1978.

CHEVALLIER, B.; HEINTZMANN, F.; MOSSERI, V.; DAUGE, J. P.; BASTIT, P. et al. Prognostic value of estrogen an progesterone receptors in operable breast cancer. **Cancer**, Philadelphia, v. 62, p. 2517-2524, 1988.

CHRAPUSTA, S.; KONOPKA, B.; PASZKO, Z.; SIEINSKI, N. et al. Immunoreactive and estrogen-binding estrogen receptors and progestin receptor levels in uterine leiomyomata and their parental myometrium. **Eur J Gynaecol Oncol**, Padua, v. 11, p. 275-281, 1990.

CLARK, J. H. Mechanism of action of steroid hormones and antagonists. In: **INFERTILITY AND REPRODUCTIVE MEDICINE CLINICS OF NORTH AMERICA**, n. 7, p. 7-19, Jan. 1992.

COOKE, B. A.; KING, R. J. B.; VAN DER MOLEN, H. J. **Hormone and ther actions. An overview of molecular aspects of steroid hormone action**. New York : Elsevier, 1988. cap. 2, p. 29-38.

DI CARLO, F.; CONTI, G.; REBOANI, C. Interference of gestagens and androgens with rat uterine oestrogen receptor. **J Endocrinol**, London, v. 77, p. 49, 1978.

DI CARLO, F.; RACCA, S.; GALLO, E. Estrogen and progesterone receptors in the human vagina. **J Endocrinol Invest**, Milano, v. 8, p. 131-134, 1985.

EVANS, L. H.; MARTIN, J. D.; HAHNEL, R. Estrogen receptor concentration in normal and pathological human uterine tissue. **J Clin Endocrinol Metabol**, Baltimore, v. 38, p. 23-32, 1974.

EVANS, L. H.; MARTIN, J. D.; HAHNEL, R. Estrogen receptor concentration in normal and pathological human uterine tissue. **J Endocrinol**, London, v. 50, p. 209-229, 1971.

FEHERTY, P.; ROBERTSON, D. M.; WAYNFORTH, H. B.; KELLIE, A. E. Changes in the concentration of high-affinity estradiol receptors in rat uterine supernatant preparations during the oestrus cycle, pseudopregnancy, pregnancy, maturation and after ovariectomy. **Biochem J**, London, v. 120, p. 837-844, 1970.

FISHMAN, J.; FISHMAN, J. H.; NISSELBAUM, J. S.; MENENDEZ-BOTET, C.; SCHWARTZ, M. K.; MARTUCCI, C.; HELLMAN, L. Measurement of the estradiol receptor in human breast tissues by the immobilised antibody method. **J Clin Endocrinol Metab**, Baltimore, v. 40, p. 724-727, 1975.

FLICKINGER, G. L.; MUECHLER, E. K.; MIKHAIL, G. Estradiol receptor in the human fallopian tube. **Fertil Steril**, Birmingham AL, v. 25, p. 900-903, 1974.

FLICKINGER, G. L.; ELSNER, C.; ILLINGWORTH, D. V.; MOECHLER, E. K.; MIKHAIL, G. Estrogen and progesterone receptors in the female genital tract of humans and monkeys. **Ann NY Acad Sci**, New York, v. 286, p. 180-189, 1977.

FOLCA, P. J.; GLASCOCK, R. F.; INVINE, W. T. Studies with tritium-labelled hexoestrol in advanced breast cancer. **Lancet**, London, v. ii, p. 796-798, 1961.

FRANCIS-DEAN, A.; UCHIMA, M. E.; MILLS, K. T.; BERN, H. A. Estrogen and progestin receptors in mouse vaginal epithelium and fibromuscular wall. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 841, p. 135-138, 1985.

FURMANSKI, P.; SAUNDERS, D.; BROOKS, S.; RICH, M. The prognostic value of estrogen receptor determinations in patients with primary breast cancer. **Cancer**, Philadelphia, v. 46 (suppl.), p. 2794-2796, 1980.

GADAN, O.; VAN IDDEKINGE, B.; SAVAGE, M.; VAN DER WALT, L. A. et al. Endocrine profile associated with estrogen and progesterone receptors in leiomyome and normal myometrium. **Gynecol Endocrinol**, Carnforth, v. 4, p. 33, 1990.

GARAU, J. M.; DI PAOLA, G. R.; CHARREAU, E. H. Estrogen and progesterone receptor assay on the vulvar epithelium. **J Reprod Med**, Chicago, v. 31, p. 987-991, 1986.

GIOCCA, D. R.; CASTRO, G.; ALONIS, L. V.; COBO, M. F.; LOTTI, H.; TEYSSI, E. A. Effect of human papillomavirus infection and estrogen receptor and heat shock protein hsp27 phenotype in human cervix and vagina. **Int J Gynecol Pathol**, New York, v. 11, p. 113-121, 1992.

GLASCOCK, R. F.; HOEKSTRA, W. G. Selective accumulation of tritium-labelled hexoestrol by the reproductive organs of immature female goats and sheep. **Biochem J**, London, v. 72, p. 673-682, 1959.

GOULD, S. F.; SHANNON, J. M.; CUHNA, G. R. The autoradiographic demonstaration of estrogen binding in normal human cervix and vagina during the menstrual cycle, pregnancy and the menopause. **Am J Anat**, New York, v. 168, p. 229-239, 1983.

GREENE, G. L.; PRESS, M. F. Steroid receptor and dynamics of the estrogen receptor. **J Steroid Biochem**, Oxford, v. 24, p. 1-7, 1986.

GREENE, G. L.; SOBEL, N. B.; KING, W. J. Immunochemical studies of estrogen receptor. **J Steroid Biochem**, Oxford, v. 20, p. 51, 1984.

GUPTA, P. D.; KHAR, A.; VIJAYASARADHI, S. Localization of estradiol receptors in rat vaginal epithelial cells in vitro. **Indian J Exp Biol**, New Delhi, v. 24, p. 679-682, 1986.

HAAFTEN, M.; WIEGERINCK, M. POORTMAN, J.; HASPELS, A.; THIJSSEN, J. Progesterone receptors in human oestrogen target tissues. **Maturitas**, Amsterdam, v. 4, p. 57-66, 1982.

HÄHNEL, R.; WOODING, T.; A BRIAN, V. Prognostic value of estrogen receptors in primary breast cancer. **Cancer**, Philadelphia, v. 44, p. 671-675, 1979.

HAWKINS, R. A.; WHITE, G.; BUNDRED, N. J.; DIXON, J. M. J.; MILLER, W. R.; STEWART, H.; FREST, A. P. M. Prognostic significance of estrogen and progestogen receptors activities in breast cancer. **Br J Surg**, London, v. 74, p. 1009-1013, 1987.

HILD-PETITO, S.; VERHAGE, H. G.; FAZLEABAR, A. T. Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptors in the baboon uterus during implantation and pregnancy. **Endocrinology**, Baltimore, v. 130, p. 2343-2353, 1992.

HOWAT, J. M. T.; BARNES, D. M.; HARRIS, M.; SWINDELL, R. The association of cytosol oestrogen and progesterone receptors with histological features of breast cancer and early recurrence of disease. **Br J Cancer**, London, v. 47, p. 629-640, 1983.

IACHELO, R.; PEPE, F.; SANFILIPPO, A.; RAYMOND, M.; CERNUTO, A. Estrogen receptors in the lower uterine segment. **Minerva Ginecol**, Torino, v. 42, p. 337-340, 1990.

IWAI, T.; MANBU, Y.; IWAI, M.; TAII, S. et al. Immunohistochemical localization of estrogen receptors and progesterone receptors in the human ovary throughout the menstrual cycle. **Virchows Arch A [Pathol Anat Histopathol]**, Berlin, v. 417, p. 369-375, 1990.

JENSEN, E. V.; DE SOMBRE, E. R. Estrogen-receptor interaction. **Science**, Washington, v. 182, p. 126-134, 1973.

JENSEN, E. V.; JACOBSON, H. I. Basic guides to the mechanism of estrogen action. **Recent Prog Horm Res**, New York, v. 18, p. 387-414, 1962.

JENSEN, E. V.; MOHLA, S.; GORELL, T. A. The role of estrophilin in estrogen action. **Vitam Horm**, New York, v. 32, p. 89-127, 1974.

JENSEN, E. V.; SUZUKI, T.; NUMATA, M.; SMITH, S. Estrogen binding substances of target tissues. **Steroids**, San Francisco, v. 13, p. 417-427, 1969.

KASTNER, M. R. O.; SCHETTINO, A. M. S.; RABELO, P. A. P.; SORAGGI, R. Determinação de receptores hormonais em lesões benignas da mama. **Rev Bras Cancerol**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 229-235, 1986.

KAWAGUCHI, K.; FUJII, S.; KOWISHI, I.; IWAI, T. et al. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors, progesterone receptors and ki67 in leiomyoma and myometrium during the menstrual cycle and pregnancy. **Virchows Arch A [Pathol Anat Histopathol]**, Berlin, v. 419, p. 309-315, 1991.

KHAN-DAWOOD, F. S.; DAWOOD, Y. Estrogen and progesterone receptor and hormone levels in human myometrium and placenta in term pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 150, p. 501-505, 1984.

KING, R. J. B.; MAINWARING, W. I. P. **Steroid cell interactions**. **Oestrogens**. Baltimore : University Park Press, 1974. p. 216-218.

KING, R. J. B.; TOWSEND, P. T.; SINDDLE, N.; WHITEHEAD, M. I.; TAYLOR, R. W. Regulation of estrogen and progesterone receptor levels in epithelium and stroma from pre and postmenopausal endometria. **J Steroid Biochem**, Oxford, v. 16, p. 21-29, 1982.

KING, W. J.; GREENE, G. L. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. **Nature**, London, v. 307, p. 745-747, 1984.

KURZON, R. M.; STERNBERGER, L. A. Estrogen receptor immunocytochemestry. **J Histochem Cytochem**, Baltimore, v. 26, p. 803-808, 1978.

LEAVIT, W. W.; TOGT, D. O.; STROTT, C. A. Regulation of progesterone receptor formation by estrogen action. **Endocrinology**, Baltimore, v. 94, p. 1041, 1974.

LENCIONI, L. J. **El colpocitograma**. Buenos Aires : Panamericana, 1962.

LINDAHL, B.; FERN, N. M.; MORGREN, A.; WILLEN, R. Spontaneous endometrial hyperplasic. The prognostic significance of steroid receptor concentration. **Anticacer Res**, Athens, v. 11, p. 1875-1877, 1991.

LING, L. Cytosol estrogen, progestin receptors and secretory endometrium in infertile women. **Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih**, Peking, v. 24, p. 198-200, 1989.

MAC LEAN, A. B.; NICOL, L. A.; HODGINS, M. B. Immunohistochemical localization of estrogen receptors in the vulva and vagina. **J Reprod Med**, Chicago, v. 35, p. 1015-1016, 1990.

MACLELLAN, M.; WEST, N.; TACHA, D.; GREENE, G.; BRENNER, R. M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors in the macaque reprodutive tract with monoclonal antiestrophilins. **Endocrinology**, Baltimore, v. 114, p. 2002-2014, 1984.

MAURER, H. R.; CHALKLEY, G. R. Some properties of a nuclear binding site of estradiol. **J Mol Biol**, London, v. 27, p. 431, 1967.

MARUGO, M.; CENTONZE, M.; BERNASCONI, D. et al. Estrogen and progesterone receptors in uterine leiomyomas. **Acta Obstet Gynecol Scand**, Umea, v. 68, p. 731-735, 1989.

MCCARTY, K. S.; MACCARTY, K. S. S. R. Steroid hormone receptors in the regulation of differentiation. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 86, p. 705-744, 1977.

MCGUIRRE, W. L.; DE LA GARZA, M.; CHAMNESS, G. C. Evaluation of estrogen receptor assays in human breast cancer tissue. **Canc Res**, Baltimore, v. 37, p. 637, 1977.

MEDINA, J. **Fisiopatologia menstrual**. São Paulo : Manole, 1972.

MENDONÇA, M.; EDVIGES, A. A.; CHAGAS, M. I. Receptores de estrogênios. **J Bras Ginecol**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 7, p. 269-271, 1989.

MUECHLER, E. K.; FLICKINGER, C. E.; MIKHAIL, G. Estradiol binding by human endometrial tissue. **Gynecol Oncol**, New York, v. 3, p. 244-250, 1975.

NATRAJAN, P. K.; MULDOON, T. G.; GREENBLATT, R. B.; MAESH, V. B. Estradiol and progesterone receptors in estrogen-primed endometrium. **Am J Obstet Gynecol**, St Louis, v. 140, p. 387-392, 1981.

NENCI, I.; BECCATI, M. D.; PIFFANELLI, A.; LANZA, G. Detection and dynamic localization of estradiol receptor complexes in intact target cells by immunofluorescence techniques. **J Steroid Biochem**, Oxford, v. 7, p. 505, 1976.

NGUYEN, B. L.; GIAMBIAGI, N.; MAYRAND, C.; LECERF, F.; PASQUALINI, J. R. Estrogen and progesterone receptors in the fetal and newborn vagina of guinea pig. Biological, mophological and ultrastructural responses to tamoxifen and estradiol. **Endocrinology**, Baltimore, v. 119, p. 978-988, 1986.

NOYES, R. W.; HERTIG, A. T.; ROCK, J. Dating the endometrial biopsy. **Fertil Steril**, Birmingham AL, v. 1, p. 3-15, 1950.

ODDÓ, H. A.; FORADORI, A. Receptores citoplasmáticos de estrogeno y progesterona en miometrio normal. **Rev Chil Obstet Ginecol**, Santiago, v. 52, p. 229-234, 1987.

PARKER, M. G. Structure and function of the oestrogen receptor. **J Neuroend**, v. 5, p. 223-228, 1993.

PERTSCHUK, L. P. Detection of estrogen binding in human mammary carcinoma by immunofluorescence: a new technic utilizing the biding hormone in a polymerized state. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, Westbury NY, v. 14, p. 771, 1976.

PERTSCHUK, L. P.; TOBIN, E. H.; BRIGATI, D. J.; KIM, D. S.; BLOOM, N. D.; GAETJENS, E.; BERMAN, P. H.; CARTER, A. C.; DEGENSHEIN, G. A. Immunofluorescent detection of estrogen receptor in breast cancer. **Cancer**, Philadelphia, v. 41, p. 907-911, 1978.

POOL, C. W.; BUIJS, R. M.; SWAAB, D. F.; BOER, G. J.; VAN LEEUWEN, F. S. On the way to specific immunocytochemical localization. In : CUELLO, A. C. (ed.) **Ibro handbook series : methods in the neurosciences**. **Immunohistochemestry**. Chichester : John Wiley, 1982. v. 3, p. 1-46.

PRESS, M. F.; GREENE, G. L. An immunocytochemical method for demonstrating receptor in human uterus using monoclonal antibodies to human estrophilin. **Lab Invest**, Baltimore, v. 50, p. 480-486, 1984.

PRESS, M. F.; NOUSEK-GOEBL, N. A.; BUR, M. Estrogen receptor localization in the gemale genital tract. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 123, p. 280-292, 1986.

PRESS, M. F.; NOUSEK-GOEBL, N. A.; KING, W. J. Immunohistochemical assesment of estrogen receptor distribution in human endometrium throughout the menstrual cycle. **Lab Invest**, Baltimore, v. 50, p. 480-486, 1984.

_____. Immunohistochemical assesment of estrogen receptor distribution in human endometrium throughout the menstrual cycle. **Lab Invest**, Baltimore, v. 51, p. 495-503, 1984.

PRESS, M. F.; UDOVE, J. A.; GRENE, G. L. Progesterone receptor distribution in the human endometrium. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 131, p. 112-124, 1984.

PUNDEL, J. P. **Les frotis vaginaux endocriniens**. Paris : Masson et cie, 1952.

PUNNONEN, R.; LUKOLA, A. Demonstration of progestin receptors in human vaginal epithelium. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, Amsterdam, v. 19, p. 97-103, 1985.

_____. High affinity binding of estrona, estradiol, and estriol in human cervical myometrium and cervical and vaginal epithelium. **J Endocrinol Invest**, Milano, v. 5, p. 203-207, 1982.

REIN, M. S.' FRIEDMAN, A. J.; STUART, J. M.; MACLANGHLIN, D. T. Fibroid and myometrial steroid receptors in women treated with gonadotropin-releasin hormone agonist leuprolide acetate. **Fertil Steril**, Birmingham AL, v. 53, p. 1018-1023, 1990.

RODBARD, D.; MUNSON, P. J.; THAKUR, A. K. Quantitative characterization of hormone receptors. **Cancer**, Philadelphia, v. 46 (suppl.), p. 2907, 1980.

SANBORN, B. M.; HELD, B.; KUO, K. S. Specif estrogen binding proteins in human cervix. **J Steroid Biochem**, Oxford, v. 6, p. 1107-1122, 1975.

_____. Estrogen and progestogen binding site concentrations in human endometrium and cervix throughout the menstrual cycle and tissue from women taking oral contraceptives. **J Steroid Biochem**, Oxford, v. 9, p. 951-955, 1978.

SAVCHENKO, O. N.; ARUTINNIAN, N. O.; BEIKROVNAIA, N. I.; LEVCHENKO, R. G.; KRUSTALEVA, G. F. The depedence of estradiol and progesterone reception in the endometrium on its histological structure in women with the syndrome of luteal phase failure. **Prohl Endokrinol (Mosk)**, Moscow, v. 36, p. 44-48, 1990.

SCATCHARD, G. The attraction of proteins for small melecules and ions. **Ann NY Acad Sci**, New York, v. 51, p. 660-672, 1949.

SCHMITT, A. Eine gradeinteilung fur die funktionelle zytodiagnostik in der gynäkologie. **Geburtshilfe Frauenheilkd**, Stuttgart, v. 13, p. 593-598, 1953.

SJOBERG, I.; CAJANDER, S.; RYLANDER, E. Morphometric characteristics of the vaginal epithelium during the menstrual cycle. **Gynecol Obstet Invest**, Basel, v. 26, p. 136-144, 1988.

SJOBERG, I.; RYLANDER, E.; SCHOULTZ, B. Menstrual variation of estrogen receptor content in vaginal tissue. **Gynecol Obstet Invest**, Basel, v. 27, p. 48-51, 1989.

SMITH, P.; HEIMER, G.; NORGREN, A.; ULMSTEN, U. Steroid hormone receptors in pelvic muscles and ligaments in women. **Gynecol Obstet Invest**, Basel, v. 30, p. 27-30, 1990.

SNIJDERS, M. P.; DE GORIJ, A. F.; DEBETS, T. E.; BAERTS, M. J. et al. Immunocytochemical analysis of estrogen receptors and progesterone receptors in the human uterus throughout the menstrual cycle and after the menopause. **J Reprod Fertil**, Oxford, v. 94, p. 363-371, 1992.

SNIJDERS, M. P.; DE GORIJ, A. F.; KOUDSTAAL, J. et al. Oestrogen and progesterone receptor in immunocytochemestry in human hyperplastic and neoplastic endometrium. **J Pathol**, Chichester, v. 166, p. 171-177, 1992.

SPEROFF, L.; GLASS, R. H.; KASE, N. K. **Endocrinologia ginecológica e infertilidade**. São Paulo: Toray, 1975.

STERNBERGER ; L. A. **Immunocytochemestry**. New Jersey : Prentice Hall Inc., 1979.

TENG, C. S.; HAMILTON, T. H. Role of chromatin in estrogen action in the uterus. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 63, p. 465-472, 1969.

TOFT, D.; GORSKI, J. A receptor molecule for estrogens : isolation from the rat uterus and preliminary characterisation. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 55, p. 1574-1581, 1966.

TONANELLI, R. N.; SERTICH, P. L.; WATSON, E. D. Soluble estrogens and progesterone receptors in the endometrium of the male. **J Reprod Fertil [Suppl]**, Oxford, v. 44, p. 267-273, 1991.

TSIBRIS, J. C.; CAZENAVE, C. R.; CANTOR, B.; NOTELOVITZ, M.; KALRA, P.; SPELLACY, W. N. Distribution of cytoplasmic estrogen and progesterone receptors in human endometrium. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v. 132, p. 454-449, 1978.

TSIBRIS, J. C. M.; FORT, F. L.; CAZENAVE, C. R.; CANTOR, B.; BARDAWIL, W. A.; NOTELOVITZ, M.; SPELLACY, W. N. The unevem distribution of estrogen and progesterone receptors in human endometrium. **J Steroid Biochem**, Oxford, v. 14, p. 997, 1981.

UNDERWOOD, J. C. E. Oestrogen receptors in human breast cancer : review of histopahological correlations and critique of histochemical methods. **Diagn Histopathol**, Chichester Sussex, v. 6, p. 1-22, 1983.

VICINI, O. S.; OGILVIE, G. K.; KATZENELLENBAGEN, J.; CARLSON, K. Measurement of estrogen receptors in normal and neoplastic lymph node tissue from dogs. **Am J Vet Res**, Schaumburg IL, v. 52, p. 2055-2059, 1991.

VOGLER, A.; RAINER, S.; LENAЗi, H. et al. Luteal phase endometrial cytosol and nuclear progesterone receptors in infertile women. **Acta Eur Fertil**, Palermo, v. 20, p. 211, 215, 1989.

WANG, J. D.; FU, Y.; SHI, W. L. et al. Immunohistochemical localization of progesterone receptor in human decidua of early pregnancy. **Hum Reprod**, Oxford, v. 7, p. 123-127, 1992.

WELSHONS, W. V.; LIBERMAN, M. E.; GORIKI, J. Nuclear localization of unocupied oestrogen receptors. **Nature**, London, v. 307, 747-749, 1984.

WIEGERINK, M.; POORTMAN, J.; AGEMA, A. R. Estrogen receptors in human vaginal tissues. **Maturitas**, Amsterdam, v. 2, p. 59-67, 1980.

WIEGERINK, M.; PORTMAN, J.; AGEMA, A. R.; DOMKER, T. H. In vivo uptake and subcellular distribution of tritium-labeled estrogens in human endometrium myometrium and vagina. **J Clin Endocrinol Metab**, Baltimore, v. 56, p. 76-86, 1983.

WILSON, P. D.; BARKER, W. G.; BARNARD, R. J.; SIDDLE, B. N. Steroid hormone receptors in the female lower urinary tract. **Urol Int**, Basel, v. 39, p. 5, 1984.

WITTLIFF, J. Steroid hormone receptors in breast cancer. **Cancer**, Philadelphia, v. 53, p. 630-642, 1984.

WOLF, H.; WAUDT, H.; JONAT, W. Immunohistochemical evidence of estrogen and progesterone receptors in the female lower urinary tract and comparison with the vagina. **Gynecol Obstet Invest**, Basel, v. 32, p. 227-231, 1991.

WRIGHT, C.; NAPIER, J.; ANGUS, B.; WETHERALL, Y. et al. Prognostic factors in breast cancer. **J Pahol**, Chichester, v. 153, p. 325-331, 1987.

YAMASHITA, S.; NEWBOLD, R. R.; McLACHLAN, J. A.; KORACH, K. S. Developmental pattern of estrogen receptor expression in female mouse genital tracts. **Endocrinology**, Baltimore, v. 125, p. 2883, 1989.

_____. The role of the estrogen receptor in uterine epithelial proliferation and cytodifferentiation in neonatal mice. **Endocrinology**, Baltimore, v. 127, p. 2456-2463, 1990.

ZAINO, R. J.; CLARKE, C. L.; FEIL, P. D.; SATYASWARROP, P. G. Differential distribution of estrogen and progesterone receptors in rabbit uterus detected by dual immunofluorescence. **Endocrinology**, Baltimore, v. 125, p. 2728-2734, 1989.