MARCO ANTONIO BASSI

**Cinética celular na endometriose profunda
infiltrativa de reto-sigmoide:
estudo anátomo-clínico**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a obten-
ção do título de Doutor em Ciências

Programa de:
Obstetrícia e Ginecologia

Orientador:
Prof. Dr. Sérgio Podgaec

São Paulo
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bassi, Marco Antonio

Cinética celular na endometriose profunda infiltrativa de reto : estudo anátomo-clínico / Marco Antonio Bassi. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Sérgio Podgaec.

Descritores: 1.Endometriose 2.Intestino grosso 3.DNA topoisomerases tipo II
4.Apoptose 5.Genes p53 6.Proteína c-erbB-2

USP/FM/DBD-217/11

Aos meus pais,
Wilson (*in memoriam*) e Jandira,
meu respeito e gratidão pela vida, pela formação e pelo amor.

À minha irmã,
Lurdes,
pela amizade e apoio.

Aos meus sogros,
Romualdo e Andrelina,
pelo incentivo e carinho.

**À minha esposa, Silvana,
mulher, mãe e companheira sempre presente,
que, com muito amor e carinho,
conduz maravilhosamente nossa família.
Meu eterno amor e admiração.**

**Aos meus filhos, Carolina e Lucas,
razões da minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Maurício Simões Abrão, amigo, exemplo, pela oportunidade, confiança e incentivo para a realização deste trabalho. A minha eterna gratidão.

Ao Doutor Sérgio Podgaec, pela impecável e competente orientação que recebi para o desenvolvimento desta tese e, principalmente, pela amizade e companherismo desde o início.

Ao Professor Doutor Edmund Chada Baracat, por ter aceitado, apoiado e auxiliado o desenvolvimento deste estudo.

Ao Professor Doutor Waldir Inácio (*in memoriam*), por ter sido o primeiro a acreditar que eu poderia chegar até aqui e pelos ensinamentos. Saudade.

Ao Professor Doutor Tsutomu Aoki, pelo apoio desde os meus primeiros dias na vida acadêmica.

Ao Doutor Victor Arias, pelo estímulo desde o início, pela realização dos estudos de citologia e anatomia patológica, pelo auxílio e entusiasmo na execução deste trabalho. Meu muito obrigado!

À Professora Doutora Silvia Regina Rogatto, pelo auxílio na execução desta pesquisa.

Aos Doutores Dario José Del Carlo Romani, Ronaldo Elias Carnut Rego e Hélio Smolentzov, amigos e companheiros de todos os dias, pelo auxílio, incentivo, companheirismo e paciência.

Ao Doutor Nicolau D'Amico Filho, pela parceria, pelo auxílio importante no desenvolvimento da técnica cirúrgica empregada neste estudo, pela amizade e pela confiança, além do imprescindível auxílio na coleta de material do grupo-controle deste estudo.

Ao Doutor João Antonio Dias Júnior, pela paciência, amizade e disposição em ensinar, ajudar e incentivar a realização deste estudo.

À Sra. Silvana Santos e a Ana Branch, pela ajuda no levantamento bibliográfico, revisão linguística e editoração do texto.

À Sra. Ana Helena Carvalho Pinto, pelo auxílio durante os atos cirúrgicos.

À Sra. Vanessa Brito Eduardo, pelo auxílio no atendimento, coleta de dados, preenchimento dos protocolos e confecção das tabelas, além do carinho e atenção, sempre, com todas as pacientes.

Às pacientes, colaboradoras fundamentais para a realização deste estudo, os meus sinceros agradecimentos.

E, sobretudo, a DEUS, por ter me permitido chegar a este objetivo, que não pensava conseguir alcançar um dia, dando-me sempre esperança, saúde e força.

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
IA	Índice de apoptose (representado pelo índice de positividade para detecção de apoptose)
IP	Índice de proliferação celular (representado pelo índice de positividade para expressão de topoisomerase II-alfa)
IRC	Índice de renovação celular (representado pelo produto da divisão do IP pelo IA)
LOH	Perda de heterozigose
RNA	Ácido ribonucleico
TdT	Deoxinucleotidil terminal-transferase
TOP2A	Topoisomerase II-alfa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados clínicos de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide (grupo experimental) e de 20 pacientes sem endometriose (grupo-controle)	45
Tabela 2	Distribuição das frequências dos sintomas de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide (grupo experimental) e de 20 pacientes sem endometriose (grupo-controle)	46
Tabela 3	Valores relativos ao número e tamanho de lesões observadas em 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide	46
Tabela 4	Distribuição das frequências relativas às camadas intestinais acometidas em 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide .	47
Tabela 5	Distribuição das frequências relativas à evidência de apoptose e de topoisomerase II-alfa em 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide (grupo experimental) e em 20 pacientes sem endometriose (grupo-controle)	51
Tabela 6	Médias e desvios-padrão dos Índices de Renovação Celular (IRC) em estroma e glândula de tecido de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide (grupo experimental) e em tecido de endométrio de 20 pacientes sem endometriose (grupo-controle) ..	53
Tabela 7	Coeficientes de correlação (CC) e significância estatística (p) na análise do grau de relacionamento entre variáveis clínicas e os IP (índice de proliferação) e IA (índice de apoptose) em glândula e estroma de lesões de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide	55
Tabela 8	Coeficientes de correlação (CC) e significância estatística (p) na análise do grau de relacionamento entre características das lesões e os IP (índice de proliferação) e IA (índice de apoptose) em glândula e estroma de lesões de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide	55
Tabela 9	Coeficientes de correlação (CC) e significância estatística (p) na análise do grau de relacionamento entre o estadiamento da doença e os IP (índice de proliferação) e IA (índice de apoptose) em glândula e estroma de lesões de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide	56

Tabela 10	Coeficientes de correlação (CC) e significância estatística (p) na análise do grau de relacionamento entre variáveis clínicas e o IRC (índice de renovação celular) em glândula e estroma de lesões de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide	56
Tabela 11	Coeficientes de correlação (CC) e significância estatística (p) na análise do grau de relacionamento entre características das lesões e o IRC (índice de renovação celular) em glândula e estroma de lesões de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide	57
Tabela 12	Coeficientes de correlação (CC) e significância estatística (p) na análise do grau de relacionamento entre o estadiamento da doença e o IRC (índice de renovação celular) em glândula e estroma de lesões de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da dinâmica de estudo	27
Figura 2	Peça cirúrgica com lesões endometrióticas em parede intestinal ...	30
Figura 3	Estadiamento da endometriose proposto pela <i>American Society for Reproductive Medicine</i> (1996)	32
Figura 4	Amostra corada com Hematoxilina-eosina (aumento de 100x), evidenciando ilha de endometriose cercada de tecido da camada muscular própria do intestino, sem evidências de fibrose. Observavam-se focos isolados de lesão	33
Figura 5	A mesma amostra, evidenciando células epiteliais (de formato cilíndrico) e células estromais (as células menores) (aumento de 350x)	34
Figura 6	(A) Foco de endometriose estromal em meio à fibrose (HE, 100x); (B) Foco de endometriose com padrões estromal e glandular bem diferenciado (HE, 400x); (C) Foco de endometriose de padrões estromal e glandular indiferenciado (HE, 400x); (D) Foco de endometriose de padrões estromal e glandular misto de diferenciação (HE, 100x)	35
Figura 7	Controle positivo para apoptose em adenocarcinoma endometrial (aumento de 1.000x)	37
Figura 8	Controle positivo para apoptose em carcinoma <i>in situ</i> de colo uterino (aumento de 1.000x)	37
Figura 9	Controle positivo para apoptose em endometriose (aumento de 1.000x)	37
Figura 10	Corte marcado com anticorpo antitopoisomerase II-alfa. Os núcleos das células epiteliais marcados na cor marrom revelam positividade para topoisomerase II-alfa (aumento de 200x)	39
Figura 11	Controle positivo para a expressão da proteína p53 em câncer de mama (aumento de 200x)	39
Figura 12	Amostra negativa para a expressão da proteína p53 (aumento de 350x)	40
Figura 13	Amostra negativa para a expressão da proteína c-erbB2 (aumento de 350x)	40

Figura 14	Representação gráfica das frequências percentuais dos Índices de Apoptose (IA) encontrados em estroma e glândula ($p = 0,65$) de lesões de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide. [Os índices de 0 a 5 se referem aos índices mínimo e máximo encontrados nesta amostra; neste grupo, não foi encontrado o índice 4]	48
Figura 15	Representação gráfica das frequências percentuais dos Índices de Proliferação (IP) encontrados em estroma e glândula ($p = 0,54$) de lesões de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide [Os índices de 0 a 6 se referem aos índices mínimo e máximo encontrados nesta amostra; neste grupo não foi encontrado o índice 5]	48
Figura 16	Representação gráfica das frequências percentuais dos Índices de Apoptose (IA) encontrados em estroma e glândula ($p = 0,64$) de endométrio de 20 pacientes sem endometriose. [Os índices de 0 a 8 se referem aos índices mínimo e máximo encontrados nesta amostra; neste grupo não foram encontrados os índices 5, 6 e 7]	49
Figura 17	Representação gráfica das frequências percentuais dos Índices de Proliferação (IP) encontrados em estroma e glândula ($p = 0,65$) em endométrio de 20 pacientes sem endometriose. [Os índices de 0 a 8 se referem aos índices mínimo e máximo encontrados nesta amostra; neste grupo não foram encontrados os índices 6 e 7]	50
Figura 18	Representação gráfica das frequências dos Índices de Apoptose (IA) e de Proliferação (IP) encontrados em estroma e glândula de tecido de endometriose de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide e de endométrio de 20 pacientes sem endometriose. [Os índices de 0 a 8 se referem aos índices mínimo e máximo encontrados nesta amostra]	52
Figura 19	Médias dos Índices de Renovação Celular (IRC) em estroma e glândula de tecido de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide (grupo experimental) e em tecido de endométrio de 20 pacientes sem endometriose (grupo-controle)	54

RESUMO

Bassi MA. *Cinética celular na endometriose profunda infiltrativa de reto-sigmoide: estudo anátomo-clínico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

INTRODUÇÃO: A endometriose, uma doença benigna, tem características invasivas com potencial proliferativo. O desenvolvimento das lesões pode ocorrer em decorrência de crescimento celular glandular e/ou estromal ou de alterações na cinética celular. Cinética celular refere-se ao equilíbrio entre a morte celular, ou apoptose, e a proliferação celular, que pode ser avaliada pela expressão de fatores de crescimento como, por exemplo, a topoisomerase 2-alfa (TOP2A). Também influenciam a cinética celular oncoproteínas como p53 e c-erB2, conhecidas por interferir na apoptose, podendo resultar em oncogênese. **OBJETIVOS:** O objetivo principal deste estudo foi comparar a cinética celular da endometriose infiltrativa de reto-sigmoide com a do endométrio eutópico de pacientes sem endometriose. Para tanto, foi avaliada a expressão de apoptose e de TOP2A bem como das oncoproteínas p53 e c-erB2. **MÉTODOS:** Foram obtidas amostras de lesões de endometriose envolvendo o reto-sigmoide de 60 mulheres com a doença e amostras de endométrio eutópico de 20 mulheres sem endometriose. A expressão de TOP2A e das proteínas p53 e c-erB2 foram quantificadas por técnica imuno-histoquímica. Método TUNEL foi utilizado para analisar os padrões de apoptose, que resultaram em índice de apoptose (IA). Índice de proliferação celular (IP) foi determinado a partir do nível de expressão de TOP2A. Índice de renovação celular (IRC) foi calculado pela razão entre IP e IA. As análises imuno-histoquímicas foram realizadas tanto no tecido endometrial como um todo, quanto nos componentes estromal e glandular separadamente. Coeficiente de Correlação de Spearman foi aplicado para identificar eventuais correlações entre variáveis clínicas, morfológicas (tamanho, quantidade e nível de invasão das lesões) e experimentais. **RESULTADOS:** Na análise da amostra do tecido como um todo, não foram evidenciadas diferenças entre os grupos experimental e controle em relação ao IA ($p = 0,389$). Por outro lado, o IP foi significativamente maior nas amostras-controle ($p < 0,001$). Na avaliação em que se sepa-

raram as células estromais dos componentes glandulares, tanto o IP quanto o IRC foram significativamente maiores no grupo-controle em comparação com o grupo experimental (IP estromal: $p = 0,006$; IP glandular: $p = 0,001$; IRC estromal: $p = 0,032$; IRC glandular: $p = 0,007$). Nas pacientes com endometriose, foi encontrada correlação entre IP e IRC glandular e o número de lesões ($p = 0,003$). Também foi observada correlação entre o IRC glandular e o tamanho das lesões ($p = 0,006$). Não houve diferença entre os grupos no que se refere à expressão de p53 e c-erbB2. **CONCLUSÕES:** A cinética celular se mostrou alterada em pacientes com endometriose do reto-sigmoide, conforme demonstrado pela redução nos níveis e na frequência de TOP2A, e pelos IP e IRC mais baixos; entretanto, apoptose e as expressões de p53 e c-erbB2 se mostraram inalteradas.

Palavras-chave: 1.Endometriose 2.Intestino grosso 3.DNA topoisomerases tipo II 4.Apoptose 5.Genes p53 6.Proteína c-erbB-2

ABSTRACT

Bassi MA. *Cell kinetics in deep infiltrating endometriosis of rectosigmoid: an anatomoclinical study* [thesis]. São Paulo: Medicine School, University of São Paulo; 2011.

BACKGROUND: Endometriosis, a benign disease, has invasive features with its proliferative potential. Development of lesions may occur due to stromal and/or glandular cell growth and to alterations in cellular kinetics. Cellular kinetics involves a balance between the regulation of cell death, or apoptosis, and cell growth, that can be evaluated by the expression of growth factors, such as topoisomerase 2-alpha (TOP2A). Oncoproteins, such as p53 and c-erB2, known to affect apoptosis resulting in oncogenesis, also influence cellular kinetics. **OBJECTIVES:** The main objective of this study was to compare the cellular kinetics in deep endometriosis involving the recto-sigmoid to eutopic endometrium from patients without endometriosis. Apoptosis and TOP2A expression were primarily evaluated, as well as p53 and c-erB2 expression. **METHODS:** Study samples were obtained from endometriosis lesions involving the recto-sigmoid in 60 women, and control samples were obtained from eutopic endometrium from 20 women without endometriosis. The expression of TOP-2A, p53 and c-erB2 proteins were quantified using immuno-histochemistry. TUNEL method was used in the analysis of apoptosis patterns, and the apoptosis index (AI) was derived. The proliferation index (PI) was derived from the level of expression of TOP-2A. Cellular renew index (CRI) was calculated from the ratio of the PI and AI. Immunohistochemical analyses were performed in two ways: on the tissue collectively, and on the stromal and glandular components separately. Spearman's correlation coefficient was used to identify the correlation between clinical, morphological (size, number and level of invasion of lesions) and the study variables. **RESULTS:** When looked at collectively, there was no difference in the AI between study and control groups ($p = 0.389$). PI, however, was noted to be significantly higher in the control samples ($p < 0.001$). When evaluating the stromal cells separately from the glandular components, the PI and CRI were both significantly

higher in the control group compared to the study group (Study stromal PI vs control stromal PI; $p = 0.006$; Study glandular PI vs study glandular PI; $p = 0.001$; Study stromal CRI vs control stromal CRI; $p = 0.032$; study glandular CRI vs control glandular CRI; $p = 0.007$). In patients with endometriosis, a correlation was found between glandular PI, CRI and number of lesions ($p = 0.003$). The same result was observed in the analysis of stromal CRI and lesion size ($p = 0.006$). There was no difference in expression of p53 and c-erbB2 between groups. **CONCLUSIONS:** Cellular kinetics is altered in endometriosis of the recto-sigmoid, as shown by the decrease in the levels and frequency of TOP2A expression, and lower PI and CRI; however, apoptosis and p53 and c-erbB2 expression were unaffected.

Keywords: 1.Endometriosis 2.Bowel 3.DNA topoisomerase type II 4.Apoptosis 5.Genes p53 6.Protein c-erbB-2

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	vi
Lista de tabelas	vii
Lista de figuras	ix
Resumo	xi
Abstract	xiii
1. Introdução	1
1.1 Endometriose	1
1.2 Cinética celular e endometriose	5
1.2.1 Apoptose	5
1.2.2 Topoisomerase II-alfa	9
1.3 Mecanismos de controle da cinética celular	12
1.3.1 Oncoproteína p53	14
1.3.2 Oncoproteína c-erb2	16
1.4 Endometriose e câncer	17
2. Proposição	22
3. Métodos	23
3.1 Local do estudo	23
3.2 Pacientes	23
3.2.1 Critérios de inclusão	24
3.3 Métodos	25
3.3.1 Dinâmica do estudo	25
3.3.2 Quadro clínico	28
3.3.3 Videolaparoscopia com ressecção de segmento de reto-sigmoide	28
3.3.4 Videolaparoscopia para realização de laqueadura	31
3.3.5 Estadiamento da endometriose	31
3.3.6 Características das lesões de endometriose do reto-sigmoide	33
3.3.7 Confirmação diagnóstica e classificação histológica	33
3.3.8 Detecção de apoptose	35
3.3.9 Reação imuno-histoquímica para pesquisa de p53, c-erb2 e topoisomerase II-alfa	38
3.4 Mensuração dos resultados	41
3.5 Análise estatística	43
4. Resultados	45
5. Discussão	59
6. Conclusões	68
7. Anexos	69
8. Referências	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 ENDOMETRIOSE

Descrita pela primeira vez por von Rokitansky em 1860 (von Rokitansky, 1861), a endometriose corresponde à presença de glândula e/ou estroma endometriais em sítios ectópicos à cavidade do útero (Metzger e Haney, 1989).

A endometriose acomete 10% a 15% das mulheres durante a menacma (Eskenazi e Warner, 1997; Abrão et al., 2000; Bianchi et al., 2007) e está presente em 40% a 60% das pacientes com dor pélvica, ressaltando-se que 2% a 22% das pacientes são assintomáticas (Farquhar, 2000). Em 5,3% a 12% dos casos a endometriose pode se instalar na parede intestinal, ocasião em que o reto-sigmoide é responsável por 55% a 80% de todas as lesões observadas nesse sítio (Abrão et al., 2003a; Darai et al., 2005; Chapron et al., 2006; 2009). Estima-se, ainda, que alguns casos de endometriose estejam relacionados com câncer (Marchevsky e Kaneko, 1978; La Grenade e Silverberg, 1988; Bassi et al., 2009).

Uma das primeiras hipóteses da etiopatogenia da endometriose foi proposta por Meyer em 1919, conhecida como a teoria da metaplasia celômica que defende a transformação de mesotélio em tecido endometrial.

Em 1927, Sampson apresentou a teoria da menstruação retrógrada, que ainda é a hipótese mais conhecida, segundo a qual haveria implante de

células endometriais provenientes do refluxo do sangue menstrual pelas tubas uterinas para a cavidade abdominal. A ocorrência desse implante seria influenciada por ambiente hormonal favorável e por fatores imunológicos que não eliminariam essas células desse local impróprio (Weed e Arguembourg, 1980; Siristatidis et al., 2006).

Essas duas teorias propostas já há quase um século ainda constituem as duas correntes principais para o entendimento da patogênese da endometriose. Ao longo dos anos, diversas outras hipóteses foram sugeridas, dentre as quais a teoria da disseminação linfática (Halban, 1925); a hipótese de disseminação hematogênica (Sampson, 1927); a teoria iatrogênica (Greenhill, 1942); a teoria composta (Javert, 1949); a teoria hormonal (Meigs, 1953); a teoria da angiogênese (Klagsbrun e D'Amore, 1991); e a teoria da inibição das matriz-metaloproteinases (Sharpe-Timms et al., 1995).

A teoria imunológica (Weed e Arguembourg, 1980) foi precursora de estudos sobre o papel etiopatogênico das interleucinas (Morgan et al., 1992), da apoptose (Kerr et al., 1994) e da catepsina D (Bergqvist et al., 1996). Nenhuma dessas teorias, porém, conseguiu elucidar de modo absolutamente seguro a etiopatogenia da endometriose.

Os diversos aspectos dessa afecção levaram Nisolle e Donnez (1997) a introduzir conceito segundo o qual a endometriose seria dividida em três doenças distintas: a doença peritoneal, a ovariana e a do septo retovaginal. A doença peritoneal é caracterizada pela presença de implantes superficiais no peritônio; a doença ovariana engloba os implantes superficiais de ovário e os endometriomas, que são os cistos típicos dessa afecção; e a doença de sep-

to retovaginal acomete as regiões retrocervical e paracervical, o septo retovaginal, o reto-sigmoide, os ureteres e a bexiga de forma infiltrativa, com lesões de profundidade maior do que cinco milímetros. Esta afecção também é denominada de endometriose infiltrativa profunda (Cornillie et al., 1990).

Sinais e sintomas que caracterizam o quadro clínico da endometriose referem-se a queixas como dismenorreia em graus variáveis, dor pélvica acíclica, dispareunia de profundidade, infertilidade e alterações intestinais e urinárias cíclicas como puxo, tenesmo, proctorragia, diarreia e/ou constipação durante o período menstrual (Abrão et al., 2003a). Nos casos de endometriose intestinal, sintomas mais específicos dependem do grau de comprometimento da parede do intestino e incluem dor retal irradiada ao períneo ao defecar (52%), constipação intestinal ou diarreia (25% a 40%) e alternância entre constipação e diarreia (14%) (Averbach et al., 2005). Alguns casos apresentam sintomas típicos de suboclusão intestinal, e casos mais graves, oclusão intestinal (Assenza et al., 2004).

A dor pélvica acíclica geralmente é mais intensa na endometriose intestinal, provavelmente devido a perda de fibras nervosas simpáticas nas camadas mucosa e muscular adjacentes às lesões de endometriose na parede intestinal e à hiperinervação observada na lesão em si (Wang et al., 2009; Ferrero et al., 2010).

O diagnóstico definitivo da doença ainda é eminentemente histológico, o que implica na utilização de métodos invasivos que possibilitem visualizar as lesões sugestivas de endometriose e permitam a obtenção de amostra tecidual (Abrão et al., 2000). De toda forma, exames de imagem são

recursos que auxiliam a investigação diagnóstica. O enema opaco também pode ser utilizado no diagnóstico de endometriose intestinal, com sensibilidade regular e baixa especificidade, com resultados que se associam aos da ultrassonografia transvaginal, porém com concordância moderada (Ribeiro et al., 2008). A ressonância magnética se mostra eficiente auxiliar diagnóstico (Douglas e Rotimi, 2004), porém a ultrassonografia transvaginal com preparo intestinal representa o exame de imagem com melhor relação custo-benefício nos casos de endometriose profunda e ovariana (Gonçalves et al., 2009; Abrão et al., 2009).

A classificação histológica das lesões endometrióticas permite a distinção entre a endometriose estromal (caracterizada pela presença de estroma morfológicamente similar ao do endométrio eutópico em qualquer fase do ciclo) e a endometriose glandular (caracterizada pela presença de epitélio superficial ou constituindo espaços glandulares ou císticos, associado a tecido com sinais de hemorragia prévia). Conforme a similaridade com o epitélio endometrial ativo, o padrão glandular é subclassificado em bem diferenciado, quando a morfologia das células epiteliais não se distingue do endométrio eutópico nas diferentes fases do ciclo; indiferenciado, quando o epitélio é aplainado ou cuboidal baixo, sem correspondente endometrial eutópico, assemelhando-se ao mesotélio do revestimento peritoneal, ou quando o epitélio é do tipo mulleriano e distinto do endometrial; e com diferenciação mista, quando há presença dos padrões anteriores na mesma localização (Abrão et al., 2003a).

1.2 CINÉTICA CELULAR E ENDOMETRIOSE

A homeostasia de tecidos normais requer equilíbrio adequado entre proliferação e morte celular, o que depende das propriedades e da atividade das células ou do conjunto de reações físico-químicas que ocorrem no microambiente celular, denominado cinética celular (Harada et al., 2004). Essa atividade tem expressão morfológica que pode ser avaliada por meio da análise da apoptose, ou morte celular programada, cuja expressão determina o Índice de Apoptose (IA), e da topoisomerase II-alfa (TOP2A), que faz parte do grupo de enzimas intimamente envolvidas em vários estágios da proliferação celular, cuja expressão determina o Índice de Proliferação Celular (IP) (Deweese et al., 2008; Singh e Bhardwaj, 2008).

1.2.1 Apoptose

A apoptose é evento importante para diversos processos fisiológicos e patológicos (Kerr et al., 1994), caracterizado pela fragmentação nuclear, formação de corpos apoptóticos contendo organelas e encolhimento celular (Kerr et al., 1994). Nesse fenômeno, o proto-oncogene bcl-2 (*B-cell lymphoma/leukaemia 2 gene*) previne a apoptose promovendo a sobrevivência celular ao bloquear o curso apoptótico final que resulta na morte celular (Jones et al., 1998).

Há evidências de que a apoptose está diretamente envolvida na regulação do ciclo menstrual, sendo responsável pela eliminação das células se-

nescentes da camada funcional do endométrio eutópico durante as fases finais do período menstrual (Harada et al., 2004). Diversos autores estudaram a expressão de bcl-2 no endométrio normal como um indicador indireto da apoptose. No epitélio glandular, a expressão de bcl-2 variou de acordo com a fase do ciclo menstrual: atingiu um pico na fase proliferativa e se mostrou ausente na fase secretória (Gompel et al., 1994; Otsuki et al., 1994; Koh et al., 1995). No epitélio estromal houve expressão de bcl-2 apenas nas células linfóides do endométrio na fase secretória final (McLaren et al., 1997). Esses achados suportam a hipótese de que a expressão de bcl-2 seria regulada pelos hormônios esteroides que controlam as alterações endometriais durante o ciclo menstrual (Otsuki et al., 1995; Koh et al., 1995).

De modo geral, os padrões apoptóticos parecem não diferir em endométrio eutópico e ectópico em mulheres com e sem endometriose (Hassa et al., 2009), mas há controvérsias na literatura a esse respeito. Já foi evidenciado que o índice de apoptose está significativamente reduzido no epitélio glandular das células do endométrio eutópico de mulheres com endometriose (Gebel et al., 1998; Dmowski et al., 2001; Braun et al., 2007), as quais parecem perder a variabilidade cíclica fisiológica da apoptose (Harada et al., 2004). Watanabe et al. (1997) observaram que as células glandulares do tecido endometriótico eutópico apresentam padrão apoptótico cíclico, o que não foi evidenciado no endométrio ectópico de mulheres com endometriose.

Parece que alterações encontradas no endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose se referem à regulação da apoptose (Gebel et al., 1998; Jones et al., 1998; Watanabe et al., 1997; Dmowski et al., 2001).

Jones et al. (1998) reportaram expressão aumentada de bcl-2 refletindo ausência de apoptose nas células estromais de tecido ectópico. Ilad et al. (2004) também observaram decréscimo importante de apoptose detectada por expressão aumentada de ubiquitina no componente estromal de tecido de endométrio ectópico, o que os levou a sugerir que as células estromais teriam papel diferenciado no desenvolvimento da endometriose. Dmowski et al. (2001), no entanto, não encontraram diferença significativa no índice apoptótico de células estromais de tecido endometriótico ectópico quando compararam mulheres com e sem endometriose.

É pertinente propor que diminuição nos índices de morte celular por apoptose viabilizaria o crescimento do tecido endometrial ectópico e, assim, seria esperada correlação inversa entre o nível de apoptose e a gravidade da doença (Harada et al., 2004). De fato, Dmowski et al. (2001) observaram tendência acentuada, mas não significativa, de índices reduzidos de apoptose estarem associados a estádios mais avançados da endometriose no tecido ectópico.

Há autores que não encontraram diferenças nos índices de apoptose em tecidos eutópicos e ectópicos de mulheres sem e com endometriose, mas evidenciaram proliferação celular significativamente aumentada nos casos de endometriose, principalmente nos implantes peritoneais (Aguiar, 2007), nos quais a redução da apoptose é geralmente mais drástica (Dufournet et al., 2001). Os índices de proliferação celular mais altos foram detectados no componente estromal do endométrio eutópico ou no componente glandular do implante ectópico (Aguiar, 2007).

Parece que a característica invasiva da lesão endometriótica decorre da redução da morte celular associada com aumento da proliferação celular (Johnson et al., 2005; Braun et al., 2007); essa assertiva se mostra plausível, uma vez que já foi evidenciado que a indução de redução da proliferação celular e de aumento de apoptose diminuiu o desenvolvimento inicial da doença em modelo animal de endometriose (González-Ramos et al., 2008).

Também em modelo experimental, Rosa e Silva et al. (2010) investigaram a caracterização do padrão homeostático de tecido endometrial eutópico e ectópico de coelhas submetidas à indução de lesões endometrióticas. Observaram maior índice de proliferação celular tanto no componente glandular quanto no estromal do tecido ectópico nas análises realizadas quatro e oito semanas após a indução das lesões. Não houve diferença no índice de apoptose nos tecidos eutópicos e ectópicos na análise realizada após quatro semanas; todavia, após oito semanas, ficou evidente a redução significativa de apoptose no tecido ectópico em relação ao eutópico. Por fim, ao calcular o índice de renovação celular (ou seja, o índice de proliferação celular dividido pelo índice de apoptose), observaram tendência acentuada de maior proliferação celular nas lesões ectópicas induzidas, revelando o favorecimento do hospedeiro ao desenvolvimento da doença.

Experimentos com substâncias como a melatonina e a sinvastatina para o tratamento da endometriose fundamentado no princípio de que o aumento de apoptose poderia resultar na regressão da lesão de endometriose têm revelado resultados promissores no epitélio glandular e no estromal, ratificando, assim, o papel da redução da apoptose na perpetuação da endometriose (Paul et al. 2010; Sokalska et al., 2010).

Por fim, Agic et al. (2009) acreditam que as evidências atualmente disponíveis sugerem que existam diferenças fundamentais nas células do endométrio de mulheres com e sem endometriose. Admitem que a apoptose desempenha papel importante na fisiopatologia da endometriose, uma vez que a proliferação celular exacerbada e a capacidade aumentada para implantação e sobrevivência em sítios ectópicos são características marcantes das células endometriais de mulheres com endometriose. Para os autores, falta apenas esclarecer se as alterações apoptóticas no endométrio eutópico de mulheres com endometriose seriam decorrentes de um processo primário ou se seriam secundárias ao desenvolvimento e estabelecimento de endometriose pélvica.

1.2.2 Topoisomerase II-alfa

A topoisomerase II é uma enzima nuclear que altera a topologia do DNA e é essencial para diversos processos nucleares como a condensação cromossômica, a separação da cromatina e o alívio do estresse torsional que ocorre durante a duplicação e a transcrição do DNA (Champoux, 2001). Uma das duas isoformas dessa enzima é denominada topoisomerase II-alfa (TOP2A), que é codificada pelo gene *TOP2A* e faz parte do grupo de enzimas intimamente envolvidas em vários estágios da multiplicação celular, estando, por isso, envolvidas na propagação de células neoplásicas (Deweese et al., 2008; Singh e Bhardwaj, 2008).

Para melhor compreensão da ação dessa enzima na célula é necessário relembrar brevemente o ciclo celular, processo em que a célula eucarionte produz células-filhas para o sustento da homeostasia ou do crescimento tecidual, e que ocorre em quatro fases: G1 (*Gap 1*), S (fase de síntese de DNA), G2 (*Gap 2*) e M (fase de mitose), além de haver uma fase de quiescência denominada G0. Nas fases G1 e G2 a célula tem determinado tempo para crescer e para retificar erros imprevistos na síntese de DNA. Esse ciclo é principalmente controlado pelas ciclinas (A e H), pelas quinases dependentes de ciclinas (CDKs), pelas proteínas inibidoras de quinases (CDK-i) e por produtos de genes supressores de tumores (p53 e Rb). A atividade das CDKs é regulada por mecanismos que incluem a fosforilação e a desfosforilação da subunidade quinase, a ativação por ciclinas, e a inibição por proteínas inibidoras que são elementos importantes na supressão de tumores (Solomon, 1993; Sherr, 1994; Reed et al., 1994; Morgan, 1995; Sherr e Roberts, 1995).

Para o estudo morfológico do ciclo celular utiliza-se, entre outros possíveis métodos, a reação imuno-histoquímica para detecção de proteínas nucleares associadas a esse ciclo, como a enzima TOP2A (Woessner et al., 1991). Assim, a TOP2A não é detectada nas células G0, mas sua atividade aumenta drasticamente durante a fase S, atingindo um pico na fase G2-M, voltando, então, a declinar (Hellemans et al., 1995). Mondal e Parvin (2001) demonstraram que a transcrição sobre os moldes de cromatina resulta no acúmulo de tensão na hélice do DNA tornando a atividade de relaxamento da topoisomerase II essencial para a síntese de RNA.

Uma vez que a TOP2A gera quebras na cadeia de DNA para completar o seu ciclo catalítico, tem o potencial de fragmentar o genoma toda vez em que funciona. Desse modo, embora essa enzima seja essencial para a sobrevivência das células proliferativas, ao mesmo tempo apresenta efeitos genotóxicos significativos, característica que a faz ser cada vez mais explorada para o desenvolvimento de diferentes drogas anticâncer (McClendon e Osheroff, 2007). Por outro lado, já há evidências de que essa enzima esteja associada a translocações cromossômicas em leucemias específicas (Deweese et al., 2008). Chen et al. (2009) relataram que a expressão aumentada de TOP2A é fator preditivo independente de prognóstico ruim nos casos de leucemia mieloide aguda, razão pela qual pode servir como marcador biológico para a estratificação de pacientes leucêmicos.

Também já está evidenciado que a expressão aumentada de TOP2A está significativamente associada com alterações na proliferação e na diferenciação celular em tumores colorretais, de estômago, endométrio e de mama (Brustmann, 2005; Tsiambas et al., 2006; Coss et al., 2009).

Sheen-Chen et al. (2010) analisaram a expressão de TOP2A em amostras de 94 pacientes com câncer de mama primário. Observaram diferentes graus de expressão da TOP2A, mas não encontraram valor prognóstico dessa expressão no câncer de mama. Apesar da associação entre expressão aumentada da TOP2A e tumores mamários, estudos recentes têm discutido o caráter ainda inconclusivo dessa associação (Oakman et al., 2009; Nielsen et al., 2010).

A expressão aumentada da TOP2A tem sido associada com as

neoplasias mais agressivas e altamente proliferativas (Hellemans et al., 1995; Deweese et al., 2008). Além disso, está integralmente envolvida com o mecanismo de ação das antraciclinas (Pritchard et al., 2008), razão pela qual é considerada importante alvo celular para as drogas quimioterápicas (Li e Liu, 2001). Diversos estudos sobre os mecanismos que regulam a expressão do gene *TOP2A* têm demonstrado como esse gene pode ser sub-regulado na resistência a essas drogas, aumentando o entendimento das funções biológicas da TOP2A (Isola et al., 2000; Mirski et al., 2000).

Recentemente, Faggad et al. (2009) sugeriram que a expressão aumentada de TOP2A estaria envolvida também na progressão do câncer de ovário, o que a torna alvo de futuras investigações que determinem o seu papel prognóstico e preditivo na evolução desse tipo de tumor.

1.3 MECANISMOS DE CONTROLE DA CINÉTICA CELULAR

Os mecanismos que regulam a cinética celular envolvida na endometriose não estão completamente elucidados. Entretanto, alguns estudos evidenciaram por técnicas de hibridização *in situ* fluorescente (*fluorescence in situ hybridization* . FISH) (Shin et al., 1997; Kosugi et al., 1999; Bischoff et al., 2002), perda de heterozigose (*loss of heterozygosity* . LOH) (Gomenou et al., 2000; Obata e Hoshiai, 2000; Thomas e Campbell, 2000) e hibridização genômica comparativa (*comparative genomic hybridization* . CGH) (Gogusev et al., 2000) que as alterações genéticas encontradas envolvem regiões cromossômicas que contêm protooncogenes e/ou genes supressores de

tumor conhecidos ou putativos, previamente relacionados com câncer de ovário, como, por exemplo, nas regiões 1q21, 9p21 e 17p13.1.

Estudo experimental recentemente publicado por Pelch et al. (2010) evidenciou que os genes 479 e 114 (associados com a matriz extracelular, adesões celulares, resposta imunológica, crescimento celular e angiogênese) se mostraram notadamente alterados em lesões de endometriose induzidas em ratas em relação às amostras de endométrio eutópico.

Prowse et al. (2006) investigaram 15 casos de endometriose ovariana, após microdissecção a laser, utilizando 12 marcadores de microssatélites mapeados próximos ou ligados a genes previamente associados com o desenvolvimento da endometriose (por exemplo, *TP16*, *TP53*, *APOA2* e *PTEN*). Os autores não detectaram perda de heterozigose na maioria das lesões e somente uma amostra apresentou essa perda no microssatélite correspondente à região cromossômica 8p22. Outros estudos que pesquisaram perda de heterozigose por análise de microssatélites (Jiang et al., 1996) e por sequenciamento automático de DNA (Jimbo et al., 1997) demonstraram a natureza monoclonal do tecido endometriótico.

Para a finalidade deste estudo, propusemo-nos conhecer o papel de duas oncoproteínas específicas, p53 e c-erB2, cuja expressão está bem estabelecida em uma série de processos neoplásicos (Ross et al., 2003; Nakamura et al., 2004; Tomasini et al.; 2008), de modo a investigar a sua forma de apresentação na endometriose profunda.

1.3.1 Oncoproteína p53

O gene *TP53* é um dos mais importantes genes supressores tumorais frequentemente mutado em cânceres humanos, o qual codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 KDa multifuncional, com atuação na regulação do ciclo celular, integridade do DNA e apoptose. A função primária dessa proteína p53 na supressão tumoral é atribuída às propriedades de fator transcripcional e regulador da expressão de diferentes genes celulares (Adimoolam e Ford, 2003).

Um importante papel da p53 na proteção do genoma celular está associado à remoção e reparo de lesões potencialmente mutagênicas ao DNA via reparo por excisão de nucleotídeos (Sengupta e Harris, 2005). Em resposta a estímulos genotóxicos, a proteína p53 é ativada por uma série de modificações estruturais e, com o auxílio de um complexo de coativadores, liga-se a regiões promotoras específicas, acionando a transcrição de genes importantes como o *XPC*, responsável pelo reconhecimento de erros no DNA. A proteína XPC se liga diretamente no local do dano ou, dependendo do tipo de erro, requer uma interação preliminar de coativadores proteicos específicos no sítio da lesão, os quais posteriormente sofrem imediata degradação proteossômica (Sengupta e Harris, 2005). Nakamura et al. (2004) sugeriram que a perda ou a inativação dos dois alelos de *TP53* e *XPC* por mutações e/ou deleções pode promover instabilidade genômica e predispor as células à transformação tumoral.

Segundo Tomasini et al. (2008) há evidências suficientes na literatura de que membros da família *TP53* sejam os principais genes reguladores na relação entre instabilidade cromossômica e câncer, pois são responsáveis pela transcrição de proteínas supressoras de tumores e desempenham papel importante no controle da ploidia celular.

A expressão da proteína p53 no núcleo da célula é considerada marcador prognóstico de vários carcinomas, como os de mama, estômago, cólon e endométrio. Nesses casos, amostras positivas para p53 seriam indicadoras de menor sobrevida do paciente e menor tempo livre da doença (Sung et al., 1996).

Coronado Martín et al. (2007) puderam estabelecer forte associação entre expressão aumentada de p53 e fatores prognósticos em carcinomas de ovário, incluindo estadios avançados da doença, tipo e grau histológico.

Interessante chamar a atenção para o fato de que Jiang et al. (1996) e Nakayama et al. (2001) não encontraram mutações do gene *TP53* em tecidos de endometriose. Por outro lado, Saínez de La Cuesta et al. (2004) encontraram expressão aumentada de p53 em 82% dos tumores de ovário associados com endometriose, em 100% dos casos de endometriose com atipia celular e apenas 11% na endometriose sem atipia celular. Neste sentido, Zubor et al. (2009) relataram que o aumento da transcrição dos genes pró-apoptóticos p53 e bcl-x em amostras de endométrio eutópico se mostrou significativamente associado com a presença de endometriose.

1.3.2 Oncoproteína c-erB2

A proteína c-erbB2 codificada pelo oncogene *ERBB2* é membro da família de receptores transmembrânicos do tipo tirosina-quinase (HER-1, HER-2, HER-3, HER-4) e apresenta elevada afinidade com substratos estimuladores de crescimento (Ross et al., 2003). A família *ERBB* participa das vias de transdução de sinais de proliferação, diferenciação, motilidade e adesão em uma variedade de linhagens celulares (Baselga e Albanell, 2001). A interação destes receptores tirosina-quinase com fatores de crescimento promove a formação de dímeros entre as diferentes proteínas c-erB2 e, consequentemente, a ativação da divisão celular. A expressão elevada de c-erB2 resulta na formação de homodímeros permanentes que se mantêm constitutivamente ativos e estão associados com vantagens proliferativas (Pupa et al., 2005).

Níveis aumentados de expressão do gene *ERBB2* são descritos em vários tipos de tumores sólidos e, particularmente, no câncer de mama, quando mostra associação a prognósticos agressivos (Ross et al., 2003).

Estudos de investigação da eventual associação entre câncer de mama e expressão de c-erB2 (Ross et al., 2003) demonstraram pior prognóstico relativo à sobrevida global para os tumores positivos para essa oncoproteína. Essa observação, porém, não se aplica ao prognóstico relativo ao tempo livre da doença, o que tem sido interpretado como deterioração da resposta ao tratamento nos casos de recidiva. Antunes et al. (2004), todavia, não observaram qualquer vantagem na determinação da expressão de c-erB2 como fator prognóstico para recidiva e sobrevida ao examinarem 66 peças histológicas de tumores primários de mama.

Nos tumores endometriais, a expressão de c-erB2 e bcl-2 parece ter papel limitado para a identificação de tumores de risco maior, enquanto fenótipos malignos mais agressivos parecem estar fortemente associados com expressão aumentada de p53 e Ki-67 (Pilka et al., 2008).

Resultados de estudo conduzido por Nasu et al. (1995) sugeriram não haver envolvimento de c-erB2 na patogênese da endometriose; porém, não há outros estudos relativos a esse tema publicados recentemente.

1.4 ENDOMETRIOSE E CÂNCER

Evidências em literatura indicam que neoplasias são fenômenos monoclonais (McDonnel, 1993; Mommers et al., 1999). Postula-se que tumores malignos se desenvolvem em decorrência de estados hiperproliferativos do epitélio; porém, mais recentemente se defende que a transformação neoplásica pode ocorrer em células que perdem a capacidade de entrar em apoptose, e que qualquer alteração no equilíbrio entre proliferação celular e apoptose pode ter papel crucial no desenvolvimento de neoplasias (Braun et al., 2007; González-Ramos et al., 2008).

Índices de proliferação celular e de apoptose são mais altos em tecidos carcinomatosos do que em epitélios normais (Allan et al., 1992). Também já foi relatada expressão aumentada de bcl-2 em uma variedade de tumores, especialmente os mamários, nos quais é inversamente proporcional à expressão de p53 (Zhang et al., 1997), embora ainda não tenha sido estabelecida relação genética consistente entre esses marcadores (Sjöström e Bergh, 2001; Pilka et al., 2008).

Ainda que o desenvolvimento de processos neoplásicos seja pouco frequente em casos de endometriose, que se configura como uma doença benigna, apesar da constante evolução do quadro, Mascaretti et al. (2007) relataram haver associação eventual entre endometriose e câncer de ovário.

Sampson (1927) foi o primeiro a relatar que a endometriose poderia favorecer o desenvolvimento de neoplasias. Posteriormente, a doença foi associada clinicamente com subtipos de neoplasias ovarianas, em particular com o carcinoma de endométrio e o de células claras de ovário (Swiersz, 2002).

Na literatura médica, vários tipos de carcinoma e sarcoma foram correlacionados com focos de endometriose (Benoit et al., 2006). Bruson et al. (1988) relataram que aproximadamente 90% desses casos apresentam carcinomas de endométrio e apenas 5% são tumores de células claras. Há cerca de 45 casos de tumores intestinais associados à endometriose relatados até o presente (Slavin et al., 2000; Jones et al., 2002; Kim et al., 2009). Desse total, 18 casos são adenocarcinomas primários localizados no reto-sigmoide, e os demais incluem sarcoma de células fusiformes, carcinoma de células escamosas, adenoacantoma, carcinosarcomas, carcinoma adenoescamoso, tumor misto de células germinativas, carcinoma de células claras, adenofibroma, adenossarcomas, hiperplasias atípicas, adenocarcinomas *in situ* de endométrio e sarcomas do estroma endometrial.

Kim et al. (2009) relataram achado de endometriose intestinal após cirurgia de intento curativo em cinco pacientes assim tratadas por apresentarem carcinomas de cólon ou reto, e sugeriram que a endometriose

intestinal deva ser também investigada em mulheres em idade reprodutiva que apresentem sintomas gastrointestinais associados com massa intestinal de origem desconhecida.

Mais recentemente, Rafailidis et al. (2010) publicaram o caso de paciente de 45 anos com queixa de sangramento retal recorrente, cuja colonoscopia revelou presença de massa polipoide retal. Exame histológico após a realização de retossigmoidectomia evidenciou presença de endometriose intestinal com envolvimento de nódulo linfático.

Estudos demonstram que o tecido de endometriose carrega potencial proliferativo e de monoclonalidade (Nilbert et al., 1995). As teorias etiopatogênicas da endometriose envolvem fatores de crescimento e citocinas associados com a regulação da multiplicação celular e a neoangiogênese que podem atuar na carcinogênese (Brinton et al., 1997). Podgaec et al. (2007) demonstraram que a endometriose, enquanto doença inflamatória, apresenta alterações no componente Th2, representadas por aumento relativo das citocinas representativas desse padrão de resposta imunológica. Parece, também, que os níveis de fator de crescimento endotelial vascular apresentam variações cíclicas no fluido peritoneal em pacientes com endometriose (Pupo-Nogueira et al., 2007).

Formas de câncer ovariano podem estar associadas a essa afecção (Erzen e Kovacic, 1998; Stern et al., 2001). Há evidências de que a endometriose é fator de risco independente para câncer de ovário (Van Gorp et al., 2004), e esse risco aumenta proporcionalmente com o tempo de duração da endometriose (Melin et al., 2006).

Alterações do gene *PTEN* foram identificadas em 21% dos endometriomas de ovário (Hitti et al., 1990). Estudos histoquímicos também evidenciaram que alterações em bcl-2 e p53 podem estar associadas com a malignização de cistos endometrióticos (Nezhat et al., 2002).

Até 2002, havia nove relatos de malignização de endometriose intestinal (Mourra et al., 2001; Cho et al., 2002; Jones et al., 2002), e casos isolados vêm sendo descritos nos últimos anos (Ulrich et al., 2003; Hoang et al., 2005; Leng et al., 2006). Trata-se geralmente de carcinomas endometrioides, e alguns se referem à transformação sarcomatosa de baixo grau.

A possibilidade de malignização da endometriose intestinal torna importante a realização de estudos específicos das características morfofuncionais do tecido endometrial ectópico que o aproximam do fenótipo neoplásico (Falco et al., 2007).

A despeito dessa possibilidade, pode-se dizer que endometriose é uma lesão benigna com caráter invasivo, e que, como demonstrado, diversos estudos já descreveram associação com neoplasias em razão do seu potencial proliferativo e de sua monoclonalidade. Modificações na cinética celular do tecido endometrial como um todo e nos compartimentos estromal e glandular isoladamente podem se relacionar com o desenvolvimento da endometriose, assim como alterações na participação de oncoproteínas essenciais para o controle do ciclo celular.

Uma vez que a literatura médica carece de estudos tanto sobre a cinética celular quanto sobre a expressão de p53 e c-erB2 em tecido de endome-

triose intestinal, a presente investigação foi desenhada com o intuito de contribuir com informações que possam elucidar o carácter proliferativo e benigno da endometriose intestinal.

2. PROPOSIÇÃO

1. Objetivo primário:

1.1 Estudar a cinética celular por meio da análise do índice de proliferação celular (expressão de topoisomerase II-alfa), do índice de apoptose e do índice de renovação celular (índice de proliferação celular dividido pelo índice de apoptose) na endometriose infiltrativa de reto-sigmoide.

2. Objetivos secundários:

2.1 Relacionar os resultados da análise da cinética celular (índices de proliferação, apoptose e renovação celular) na endometriose infiltrativa de reto-sigmoide com:

- a) as características clínicas das pacientes;
- b) as características morfológicas das lesões;
- c) a classificação histológica das lesões.

2.2 Avaliar a expressão das oncoproteínas p53 e c-erB2 na endometriose infiltrativa do reto-sigmoide.

3. MÉTODOS

3.1 LOCAL DO ESTUDO

Este estudo transversal retrospectivo foi realizado no Setor de Endometriose da Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMUSP, datada de 14 de março de 2007, conforme Protocolo 1328/06 (Anexo 1), adequado e novamente aprovado em agosto de 2010, e com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis (Protocolo 761).

3.2 PACIENTES

A aplicação da metodologia de Cochran (1986) para o cálculo amostral adequado indicou ~~60~~ de 60 pacientes, considerando adoção da distribuição normal para as variáveis paramétricas; fixação da margem de erro aceitável em 17,5%; e representatividade de 50% para a variável-núcleo do estudo. Pela mesma metodologia e considerando margem de erro aceitável de 20%, determinou-se amostra mínima composta de 20 elementos para a construção do grupo-controle.

Desse modo, de um grupo de 100 pacientes com diagnóstico de endometriose do reto-sigmoide que, entre 2002 e 2009, foram submetidas à vi-

deolaparoscopia cirúrgica para exereses das lesões, selecionaram-se 60 pacientes que atendiam rigorosamente aos critérios de inclusão adotados para o estudo.

O grupo-controle, por sua vez, foi formado por 20 pacientes submetidas à laqueadura videolaparoscópica e a coleta de endométrio eutópico foi realizada durante o ato cirúrgico.

Todas as pacientes leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos 2 e 3).

3.2.1 Critérios de inclusão

Foram adotados os seguintes critérios de inclusão para a seleção das pacientes com endometriose infiltrativa de reto-sigmoide que compuseram o grupo experimental:

- (1) idade entre 18 e 45 anos;
- (2) diagnóstico histológico de lesão de endometriose profunda infiltrativa de reto, conforme visualização pré-operatória em um ou mais exames diagnósticos de imagem (ressonância magnética, ultrassonografia e/ou ecoendoscopia baixa);
- (3) sem história conhecida de câncer;
- (4) sem uso de qualquer medicação hormonal por pelo menos seis meses antes da cirurgia.

Para a composição do grupo-controle, foram utilizados os mesmos critérios de inclusão, exceto pela história clínica, exame clínico e exames de

imagem não serem sugestivos de endometriose e pela confirmação de ausência de endometriose durante vídeolaparoscopia para laqueadura.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Dinâmica do estudo

Todas as pacientes com endometriose infiltrativa de reto-sigmoide foram avaliadas pela história clínica, exame físico e exames complementares (CA125, ultrassonografia pélvica e/ou transvaginal com preparo intestinal, ecoendoscopia baixa e ressonância magnética, quando indicada), conforme indicação clínica para definição da suspeita de endometriose. Todas as pacientes foram submetidas à colonoscopia com a finalidade de excluir outras doenças colônicas concomitantes.

Após a identificação de sintomas da doença, principalmente dor crônica refratária aos tratamentos clínicos prévios, aliada a sintomas e alterações intestinais, e a confirmação por exames de imagem de sinais de endometriose comprometendo o reto-sigmoide, com profundidade maior que a camada muscular interna, indicou-se a videolaparoscopia com ressecção desse segmento intestinal.

A videolaparoscopia com ressecção de segmento do reto-sigmoide contendo a lesão e com anastomose primária por duplo grampeamento foi realizada conforme a rotina habitual do serviço, sempre com a mesma técnica e pela mesma equipe cirúrgica em pacientes sintomáticas, com lesões

comprometendo o reto e o sigmoide, com dois ou mais centímetros de extensão, ou multifocais, infiltrando a parede intestinal além da camada muscular interna.

Os blocos de endometriose fixados em formalina e incluídos em parafina foram recuperados dos arquivos do laboratório de Anatomia Patológica e revistos para a escolha de tecido representativo da lesão. As amostras assim obtidas e selecionadas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e analisadas por dois patologistas em microscópio óptico convencional.

Com relação ao grupo-controle, as pacientes encaminhadas pelo Programa de Controle Familiar do Estado de São Paulo, após completa avaliação clínica e laboratorial, para realização de laqueadura foram interrogadas quanto à presença de sintomas de endometriose. Realizaram dosagem de CA125, BHcG e ultrassonografia pélvica, além de completo exame físico e ginecológico. Durante o procedimento videolaparoscópico para laqueadura, completo inventário da cavidade abdominal e pélvica descartou a presença de focos de doença endometriótica, inclusive nas pacientes assintomáticas.

Na Figura 1 se encontra a representação esquemática da dinâmica do estudo.

Figura 1. Representação esquemática da dinâmica de estudo.

3.3.2 Quadro clínico

Todas as pacientes foram questionadas quanto à presença de cinco sintomas associados à endometriose, a saber:

1) dismenorreia: dor em cólica no período menstrual que, para inclusão da paciente no grupo com doença, devia se apresentar severa (quando a paciente referia que a dor não melhorava completamente com analgésicos, embora não a impedisse de exercer suas atividades habituais) ou incapacitante (quando a paciente referia que a dor a impedia de exercer suas atividades habituais) (Laufer e Goldstein, 1998);

2) dispareunia de profundidade: dor pélvica durante a relação sexual;

3) dor pélvica acíclica: dor pélvica sem relação com o ciclo menstrual por pelo menos seis meses, sem melhora com a utilização de analgésicos;

4) alterações intestinais cíclicas: sintomas intestinais durante o período menstrual, incluindo aceleração ou diminuição do trânsito intestinal, dor à evacuação, puxo, tenesmo e/ou sangramento nas fezes;

5) alterações urinárias cíclicas: sintomas urinários durante o período menstrual, incluindo disúria, hematúria, polaciúria e/ou urgência miccional.

3.3.3 Videolaparoscopia com ressecção de segmento de reto-sigmoide

Com a paciente em decúbito dorsal horizontal e posição semiginecológica, sob anestesia geral, agulha de Veres era introduzida em incisão umbilical, confeccionando-se pneumoperitônio com 2,5 litros de CO₂, procedimen-

to seguido pela colocação de trocáter de 11 mm para a introdução de ótica de 0 (zero) grau. Mais dois trocáteres de 5 mm eram colocados na mediana, um entre a crista ilíaca e o hipocôndrio direito, em linha hemiclavicular, e o outro contralateral na mesma posição. Um último trocáter de 12 mm era, então, colocado em FID baixa mais mediana, lateralmente aos vasos epigástricos.

Em seguida, as lesões e o grau de comprometimento da pelve eram identificados. Procedia-se à manipulação uterina com manipulador previamente introduzido.

Liberava-se, primeiro, o cólon sigmoideo pela face medial do mesentério e, então, a goteira parietocólica esquerda, seguindo-se a identificação de ureter e vasos, além da emergência do plexo sacro e nervo hipogástrico com sua preservação.

Realizava-se a ligadura de vasos do reto e/ou do sigmoide, conforme a altura da lesão. Procedia-se à dissecação até abaixo da reflexão peritoneal ou da lesão identificada, com margem de pelo menos 2 cm de reto livre de doença, efetuando-se a sua secção com grampeador linear 45 mm (Ethicon®, Johnson & Johnson do Brasil). Outras lesões associadas em outros sítios de doença na pelve e fora dela eram tratadas quando necessário.

Realizava-se abertura de incisão Pfannenstiel com 3 a 4 cm de largura para a retirada de peça do reto (Figura 2) e a introdução de ogiva de grampeador circular 33 mm (Ethicon®, Johnson & Johnson do Brasil) para anastomose término-terminal, que ocorria após a reintrodução do intestino na cavidade e o seu fechamento.

Figura 2. Peça cirúrgica com lesões de endometriose em parede intestinal no momento de sua retirada (à esquerda) e e com a pinça se aproximando de uma das lesões (à direita).

A anastomose era realizada com grampeador circular, e realizavam-se as provas de segurança. Para tanto, era introduzida seringa de 60 cc com ar em reto e, com a pelve cheia de soro, avaliava-se a presença ou não de extravasamento de ar pela anastomose; em seguida, injetava-se soro com azul de metileno também com seringa de 60 cc pelo reto, para novamente avaliar extravasamento pela linha de sutura. Por fim, realizava-se drenagem da cavidade com dreno a vácuo, retirada de pneumoperitônio e dos trocâteres e fechamento da pele.

3.3.4 Videolaparoscopia para a realização de laqueadura

Com a paciente sob anestesia geral, posicionada em decúbito dorsal horizontal e em posição semiginecológica, colocava-se o espéculo vaginal, pinçava-se o colo uterino e introduzia-se o dispositivo plástico PIPELLE® (*Cooper Surgical*) para obtenção de biópsia de endométrio eutópico por sucção, colocando-se, em seguida, o manipulador uterino. A agulha de Veres era, então, introduzida em incisão umbilical, confeccionando-se pneumoperitônio com 2,5 litros de CO₂, procedimento que era seguido pela colocação de trocáter de 11 mm para a introdução de ótica de zero (0) grau. Mais dois trocâteres de 5 mm eram colocados nas fossas ilíacas direita e esquerda baixas, mais medianas, lateralmente aos vasos epigástricos.

Na sequência, era realizado inventário de toda a cavidade abdominal e pélvica, momento em que era excluída a presença de qualquer lesão, incluindo-se endometriose.

Apreendia-se, então, a tuba uterina e procedia-se à cauterização do seu terço médio e à sua secção. Por fim, procedia-se à revisão de hemostasia e terminava-se o procedimento com o fechamento da pele.

3.3.5 Estadiamento da endometriose

De acordo com os critérios estabelecidos em 1985 e revistos em 1996 pela *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM, 1997), a endometriose foi classificada, durante o procedimento cirúrgico, em estádios I a IV, conforme a Figura 3.

Estadio I (mínima): 1-5 Estadio II (leve): 6-15
 Estadio III (moderada): 16-40 Estadio IV (severa): > 40

ENDOMETRIOSE		< 1 cm	1 - 3 cm	> 3 cm
PERITÔNIO	Superficial	1	2	4
	Profunda	2	4	6
OVÁRIO	D Superficial	1	2	4
	D Profunda	4	16	20
	E Superficial	1	2	4
	E Profunda	4	16	20
OBLITERAÇÃO DO FUNDO DE SACO POSTERIOR		Parcial 4	Completa 40	
ADERÊNCIAS		< 1/3 envolvido	1/3 . 2/3 envolvidos	> 2/3 envolvidos
OVÁRIO	D Velamentosa	1	2	4
	D Densa	4	8	16
	E Velamentosa	1	2	4
	E Densa	4	8	16
TROMPA	D Velamentosa	1	2	4
	D Densa	4*	8*	16
	E Velamentosa	1	2	4
	E Densa	4*	8*	16

(*) Se as fímbrias tubárias estiverem totalmente envolvidas por aderências, mude o escore para 16.

Porcentagem de implantes:

Lesões vermelhas (claras, vermelhas, rosadas, em chama, vesículas):

%

Lesões brancas (brancas, amareladas, marrons, defeitos de peritônio):

%

Lesões pretas (pretas, depósitos de hemossiderina, azuis):

%

Endometriose adicional:

Patologias associadas:

Figura 3. Estadiamento da endometriose proposto pela American Society for Reproductive Medicine (1996).

3.3.6 Características das lesões de endometriose do reto-sigmoide

A análise anátomo-patológica de cada segmento de reto-sigmoide ressecado permitiu ao patologista determinar o número de lesões presentes (por contagem), o tamanho dessas lesões (com uso de régua milimétrica), expresso em milímetros, e a camada da parede intestinal acometida.

3.3.7 Confirmação diagnóstica e classificação histológica

As amostras de endometriose FFEP (fixadas em formalina e em blocos de parafina) foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e analisadas em microscópio óptico convencional para a confirmação diagnóstica da doença endometriótica. As Figuras 4 e 5 ilustram amostra corada com HE evidenciando ilha de endometriose cercada de tecido da camada muscular própria do intestino, sem evidências de fibrose. Observam-se focos isolados de lesão.

Figura 4. Amostra corada com Hematoxilina-Eosina (aumento de 100x), evidenciando ilha de endometriose cercada de tecido da camada muscular própria do intestino, sem evidências de fibrose. Observam-se focos isolados de lesão.

Figura 5. A mesma amostra, evidenciando células epiteliais (de formato cilíndrico) e células estromais (as células menores) (aumento de 350x).

A análise histológica dos tecidos ressecados seguiu os padrões da classificação proposta por Abrão et al. (2003b), que divide a doença em: a) padrão estromal: presença de estroma morfológicamente similar ao do endométrio eutópico em qualquer fase do ciclo (Figura 6a); b) padrão glandular bem diferenciado: presença de epitélio superficial ou constituindo espaços glandulares ou císticos, composto por células epiteliais com morfologia indistinguível dos endométrios tópicos na diferentes fases do ciclo menstrual (Figura 6b); c) padrão glandular indiferenciado: presença de epitélio superficial ou constituindo espaços glandulares ou císticos, sem as características morfológicas vistas no epitélio endometrial eutópico (Figura 6c); d) padrão glandular misto de diferenciação: presença, na mesma localização, de epitélios com padrão bem diferenciado e indiferenciado (Figura 6d). Para efeitos do estudo, foram agrupadas as lesões indiferenciadas e mistas (com indiferenciação) e as lesões bem diferenciadas e estromais (sem indiferenciação).

Figura 6. (A) Foco de endometriose estromal em meio à fibrose (HE, 100x); (B) Foco de endometriose com padrões estromal e glandular bem diferenciado (HE, 400x); (C) Foco de endometriose de padrões estromal e glandular indiferenciado (HE, 400x); (D) Foco de endometriose de padrões estromal e glandular misto de diferenciação (HE, 100x).

3.3.8 Detecção de apoptose

Apoptose foi detectada por meio da marcação de pontos de quebra de DNA por DUPT-biotina mediada por deoxinucleotidil terminal-transferase (TUNEL) realizada com o emprego do kit Apop-Tag Plus Peroxidase (*Intergen Company*, Burlington, MA, USA) por técnica previamente descrita e modificada (Gavrieli et al., 1992; Ansari et al., 1993).

Cortes histológicos de tecido endometrial (5) fixados em formol a 10% e emblocados em parafina foram montados em lâminas previamente silanizadas (3-aminopropiltrietoxisilano, Sigma do Brasil). Depois de despara-

finalizados e re-hidratados, as lâminas foram lavadas com PBS com pH = 7,2, e os cortes foram submetidos à digestão em solução de tripsina (Sigma do Brasil) a 0,25mg% em estufa a 37°C por dois minutos e lavados em água deionizada.

O bloqueio da peroxidase endógena foi alcançado lavando-se as lâminas com água oxigenada a 3%. Depois da aplicação de tampão de equilíbrio fornecido pelo fabricante, as lâminas foram incubadas com solução contendo a enzima deoxinucleotidil terminal-transferase (TdT) e nucleotídeos conjugados à digoxigenina por uma hora a 37°C. Interrompeu-se a reação pela incubação das lâminas em tampão de interrupção fornecido pelo fabricante por 10 minutos à temperatura ambiente. Depois da lavagem das lâminas, foram identificados os nucleotídeos incorporados. Para tanto, os cortes foram incubados com anticorpo antidigosigenina conjugado à peroxidase, e a reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB). A contracoloração foi feita com hematoxilina de Harris. Utilizou-se tecido endometrial como controle positivo. O controle negativo foi obtido pela substituição da solução de enzima TdT e nucleotídeos conjugados à digoxigenina por tampão fosfato. As Figuras 7 a 9 ilustram positividade para apoptose respectivamente em adenocarcinoma endometrial, em carcinoma *in situ* de colo de útero e em endometriose. A detecção de apoptose em material colhido a fresco das pacientes do grupo-controle foi realizada com os mesmos métodos empregados para o grupo experimental.

Figura 7. Controle positivo para apoptose em adenocarcinoma endometrial (aumento de 1.000x).

Figura 8. Controle positivo para apoptose em carcinoma *in situ* de colo uterino (aumento de 1.000x).

Figura 9. Controle positivo para apoptose em endometriose (aumento de 1.000x).

3.3.9 Reação imuno-histoquímica para pesquisa de p53, c-erbB2 e topoisomerase II-alfa

A reação imuno-histoquímica para pesquisa de proteína p53, c-erbB2 e topoisomerase II-alfa (TOP2A) foi realizada utilizando-se anticorpos da marca DAKO (Glostrup, Dinamarca), por técnica descrita previamente, com pequenas modificações (Gorczyca et al., 1995). Brevemente, os cortes histológicos de tecido intestinal (5 μ) fixado em formol a 10% em blocos de parafina foram montados em lâminas previamente silanizadas (3-aminopropiltrietoxissilano, marca Sigma). Após desparafinização e re-hidratação, foram imunocorados utilizando-se o método do complexo streptavidina-biotina-peroxidase (kit LSAB+, DAKO, Glostrup, Dinamarca). O bloqueio da peroxidase endógena foi alcançado lavando-se as lâminas com água oxigenada a 3%, e a recuperação antigênica por calor úmido em tampão citrato 10 mM, pH 6,0 (quatro minutos marcados após atingir-se o ponto de fervura), utilizando-se panela de pressão convencional. Os anticorpos primários utilizados foram antirreceptor de proteína p53 (clone DO7, monoclonal, DAKO, Glostrup, Dinamarca) diluído a 1/300, antioncoproteína c-erbB2 (policlonal, DAKO, Glostrup, Dinamarca) diluído a 1/200 e antitopoisomerase II-alfa (clone Ki-S1, monoclonal, DAKO, Glostrup, Dinamarca) diluído a 1/50.

Cortes histológicos de amígdalas palatinas serviram de controles positivos para TOP2A. Carcinomas mamários com positividade conhecida para proteína p53 e oncoproteína c-erbB2 foram utilizados como controles positivos para essas reações. Os controles negativos foram obtidos substituindo-

se o anticorpo primário por solução salina tamponada. As Figuras 10 e 11 ilustram amostras positivas para TOP2A e para expressão da proteína p53. As Figuras 12 e 13 ilustram amostras negativas para a expressão da proteína p53 e para a expressão do produto de oncone c-erbB2.

Figura 10. Corte marcado com anticorpo antitopoisomerase II-alfa. Os núcleos das células epiteliais marcados na cor marrom revelam positividade para topoisomerase II-alfa (aumento de 200x).

Figura 11. Controle positivo para a expressão da proteína p53 em câncer de mama (aumento de 200x).

Figura 12. Amostra negativa para a expressão da proteína p53 (aumento de 350x).

Figura 13. Amostra negativa para a expressão da oncoproteína c-erbB2 (aumento de 350x).

A reação imuno-histoquímica para pesquisa de proteína p53, c-erbB2 e TOP2A em material das pacientes do grupo-controle foi realizada com os mesmos métodos empregados para o grupo experimental.

3.4 MENSURAÇÃO DOS RESULTADOS

A análise dos resultados para detecção de apoptose, TOP2A, p53 e c-erbB2 foi realizada por quantificação direta. Brevemente, utilizou-se microscópio marca Nikon modelo Labophot com ocular de 26,5 mm (10x) e diâmetro de campo de 0,53 mm em aumento de 40x (campo de 0,22 mm²) para contagem de células. Foram consideradas áreas com maior número de núcleos marcados pela reação imuno-histoquímica (coloração acastanhada).

Uma reação foi considerada positiva para a proteína p53 quando pelo menos 30% dos núcleos das células epiteliais se apresentavam fortemente corados no tecido. A avaliação dos resultados para a oncoproteína c-erbB2 seguiu um sistema de pontuações (escores). Assim:

0: nenhuma célula positiva ou positividade em menos de 10% das células;

(1+): imunorreatividade de membrana, fraca e irregular em pelo menos 10% das células;

(2+): imunorreatividade de membrana, de intensidade fraca a moderada, porém regular em mais de 10% das células;

(3+): imunorreatividade de membrana, com forte intensidade, em pelo menos 10% das células.

Foram considerados positivos casos com pontuação 2+ e 3+. Os demais foram considerados negativos.

Para avaliação da apoptose, foram considerados elementos apoptóticos aqueles que se enquadravam nos critérios morfológicos descritos como corpos apoptóticos, a saber: células com diminuição do volume citoplasmático, marginação da cromatina, vitrificação, condensação e fragmentação citoplasmática presentes no interior de macrófagos, células epiteliais ou livres pelo estroma.

De acordo com os critérios histológicos previamente padronizados e adotados pelo patologista, pelo menos 500 células de cada corte foram contadas para a avaliação do índice de apoptose, e 1.000 células para avaliação da expressão da TOP2A.

Os resultados foram expressos como índices de positividade (quociente entre o número de núcleos marcados e o número total de núcleos contados) e individualizados para o componente epitelial e para o componente estromal do tecido endometriótico. O índice de positividade para TOP2A foi denominado índice de proliferação celular (IP), e se considerou evidência de TOP2A mediante $IP \geq 1$. O índice de positividade para células apoptóticas foi denominado índice de apoptose (IA), e se considerou evidência de apoptose mediante $IA \geq 1$. O quociente IP/IA também foi calculado, resultando em índice de renovação celular (IRC). Esses índices são representados por números aleatórios de zero (fenômeno ausente) ao infinito.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram tabulados em planilha Excel (Microsoft®) para aplicação dos cálculos pertinentes por meio do programa SSPS para Windows, versão 17.0.

Aplicou-se a *Prova do Qui-quadrado* para a comparação das frequências observadas nos grupos de estudo no que concerne à raça e ao quadro clínico das pacientes e à evidência de apoptose e de TOP2A. Pelo mesmo teste, compararam-se as frequências relativas ao IA e ao IP encontrados em estroma e em glândula tanto no grupo experimental quanto no grupo controle.

O *Teste t de Student* foi aplicado para a comparação de dados expressos em médias $\pm$ desvios-padrão, como a idade das pacientes (comparação entre os grupos de estudo), o IP, o IA e o IRC (comparação entre os achados em estroma e em glândula).

O grau de relacionamento entre o IP, o IA e o IRC em estroma e glândula e as variáveis de interesse (idade, quadro clínico, estadiamento da doença [ASRM, 1996], número de lesões, tamanho da lesão, camada acometida da camada intestinal e classificação histológica) foi determinado com a aplicação da *Análise de Correlação de Spearman*, que gera um coeficiente de correlação que varia de -1 a +1. Quanto mais distante de zero e mais próximo das extremidades, maior a correlação entre as variáveis. Coeficientes positivos (entre 0 e +1) indicam que as variáveis se correlacionam no mesmo sentido, enquanto coeficientes negativos (entre -1 e 0) indicam que

as variáveis se correlacionam em sentido oposto. Essas correlações podem ser classificadas em perfeitas ($=1$), fortes ($>0,75$), médias ($>0,50$), fracas ($<0,50$) e inexistentes ($=0$), e sofrem grande influência do tamanho e da variabilidade das amostras, razão pela qual se deve buscar o valor de p que determina a significância do coeficiente de correlação encontrado.

Foi adotado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,050$) para a avaliação dos resultados da aplicação dos testes estatísticos.

4. RESULTADOS

Os dados clínicos individuais das 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide do grupo experimental e das 20 pacientes sem endometriose do grupo-controle se encontram nos Anexos 4 e 5, respectivamente. As médias de idade dos grupos experimental e controle foram similares ($p = 0,528$), assim como não houve diferença na distribuição das frequências relativas à raça ($p = 0,229$) das pacientes na comparação entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Dados clínicos de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide (grupo experimental) e de 20 pacientes sem endometriose (grupo-controle).

Experimentais e de 26 pacientes com endometriose (grupo controle).			
Dados clínicos	Grupos		p
	Experimental	Controle	
Idade			
Menor	22	26	
Maior	45	40	
Média ± Desvio-padrão	33,8 ± 5,9	32,9 ± 4,3	0,528
Raça			
Branca	50 (83,3%)	16 (80,0%)	
Negra	6 (10,0%)	4 (20,0%)	
Amarela	4 (6,7%)	0 (-)	0,229

A distribuição das frequências relativas aos sintomas clínicos referidos pelas pacientes com endometriose do reto-sigmoide e sem endometriose está na Tabela 2 e, como esperado, as poucas ocorrências de sintomatologia no grupo-controle foram significativamente menos frequentes do que no grupo experimental. A frequência de alterações urinárias cíclicas encontrada no

grupo experimental (15,0%) não foi significativa em relação ao grupo-controle, embora nenhuma das pacientes desse último grupo tenha relatado esse sintoma.

Tabela 2. Distribuição das frequências dos sintomas de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide (grupo experimental) e de 20 pacientes sem endometriose (grupo-controle).

Sintomas	Grupos				p
	Experimental		Controle		
	(n = 60)		(n = 20)		
	n	%	n	%	
Dismenorreia	60	100,0%	3	15,0%	< 0,001*
Alterações intestinais cíclicas	50	83,3%	1	5,0%	< 0,001*
Dor pélvica crônica	49	81,7%	0	0	< 0,001*
Dispareunia de profundidade	49	81,7%	2	10,0%	< 0,001*
Alterações urinárias cíclicas	9	15,0%	0	0	0,367

A caracterização das lesões de endometriose do reto-sigmoide nas pacientes do grupo experimental, em relação ao número e tamanho, está apresentada na Tabela 3, e as camadas intestinais acometidas pela doença estão indicadas na Tabela 4.

Tabela 3. Valores relativos ao número e tamanho (em milímetros) de lesões observadas em 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide.

Características da lesão	Valores			
	Mínimo	Máximo	Média	Desvio-padrão
Número	1,0	4,0	1,3	0,6
Tamanho (mm)	8,0	65,0	26,9	12,3

Tabela 4. Distribuição das frequências relativas às camadas intestinais mais profundas acometidas em 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide.

Camadas acometidas	Frequências	
	n	%
Mucosa	3	5,0%
Submucosa	17	28,3%
Muscular interna	39	65,0%
Muscular externa	1	1,7%
Total	60	100,0%

Todas as pacientes com endometriose do reto-sigmoide do grupo experimental se encontravam no estadio III ou IV da classificação da ASRM (1996).

Histologicamente, todas as lesões exibiam padrão glandular, sendo 56 (93,3%) do tipo indiferenciado e as demais quatro (6,7%) do tipo sem indiferenciação. Neste grupo de pacientes com endometriose do reto-sigmoide não foram encontradas lesões de padrão estromal puro.

Inicialmente, foram comparadas as frequências em que os diferentes IA e IP foram encontrados em estroma e glândula da lesão intestinal (no grupo experimental) e do endométrio eutópico (no grupo-controle).

No grupo de pacientes com endometriose do reto-sigmoide, foram encontradas evidências de apoptose em estroma e glândula em, respectivamente, 50,0% e 55,0% dos casos (Figura 14). Expressão de TOP2A em estroma e glândula foi evidenciada em 76,7% e 70,0% das amostras, respectivamente (Figura 15). Não houve diferença significativa entre os índices de proliferação celular do estroma e da glândula ($p = 0,54$), nem entre os índices de apoptose nesses compartimentos ($p = 0,67$), indicando que o tecido de endometriose cresce homogeneamente.

Figura 14. Representação gráfica das frequências percentuais dos Índices de Apoptose (IA) encontrados em estroma e glândula ($p = 0,65$) de lesões de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide. [Os índices de 0 a 5 se referem aos índices mínimo e máximo encontrados nesta amostra; neste grupo, não foi encontrado o índice 4.]

Figura 15. Representação gráfica das frequências percentuais dos Índices de Proliferação (IP) encontrados em estroma e glândula ($p = 0,54$) de lesões de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide. [Os índices de 0 a 6 se referem aos índices mínimo e máximo encontrados nesta amostra; neste grupo não foi encontrado o índice 5.]

No grupo-controle, foram encontradas evidências de apoptose em estroma e glândula em 60,0% e 55,0% das amostras, respectivamente (Figura 16). A expressão de TOP2A foi encontrada tanto em estroma quanto em glândula em 100,0% casos (Figura 17). Não houve diferença estatística entre os índices de proliferação celular do estroma e da glândula ($p = 0,65$), assim como entre os índices de apoptose nesses compartimentos ($p = 0,64$).

Figura 16. Representação gráfica das frequências percentuais dos Índices de Apoptose (IA) encontrados em estroma e glândula ($p = 0,64$) de endométrio de 20 pacientes sem endometriose. [Os índices de 0 a 8 se referem aos índices mínimo e máximo encontrados nesta amostra; neste grupo não foram encontrados os índices 5, 6 e 7.]

Figura 17. Representação gráfica das frequências percentuais dos Índices de Proliferação (IP) encontrados em estroma e glândula ($p = 0,65$) em endométrio de 20 pacientes sem endometriose. [Os índices de 0 a 8 se referem aos índices mínimo e máximo encontrados nesta amostra; neste grupo não foram encontrados os índices 6 e 7.]

Foram, então, comparadas as frequências relativas às evidências de TOP2A e de apoptose entre os grupos, bem como as médias e desvios-padrão dos IP e IA.

Evidências de TOP2A tanto em estroma ($p = 0,006$) quanto em glândula ($p = 0,001$) foram significativamente mais frequentes nas amostras de endométrio de pacientes sem endometriose, quando comparadas com as amostras de lesões de endometriose do reto-sigmoide. Essa diferença não foi observada em relação às evidências de apoptose (Tabela 5).

As médias do IP em estroma ($2,8 \pm 1,6$) e glândula ($3,2 \pm 1,6$) no grupo-controle foram significativamente maiores ($p < 0,001$) do que essas médias observadas nas lesões de endometriose (respectivamente, $1,2 \pm 0,9$ e

1,2 $\pm$ 1,2). Já as médias do IA em estroma (1,1 $\pm$ 1,2) e glândula (1,4 $\pm$ 1,9) no grupo-controle foram estatisticamente similares ($p = 0,389$) às observadas nas lesões com endometriose (respectivamente, 0,8 $\pm$ 1,1 e 0,9 $\pm$ 0,9).

Tabela 5. Distribuição das frequências relativas à evidência de apoptose e topoisomerase II-alfa em 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide (grupo experimental) e em 20 pacientes sem endometriose (grupo-controle).

e em 20 pacientes sem endometriose (grupo controle).						
Evidências		Grupo experimental		Grupo-controle		p
		(n = 60)		(n = 20)		
		n	%	n	%	
Apoptose	Estroma	30	50,0%	12	60,0%	0,303
	Glândula	33	55,0%	11	55,0%	0,806
Topoisomerase II-alfa	Estroma	46	76,7%	20	100,0%	0,006*
	Glândula	42	70,0%	20	100,0%	0,001*

A título de ilustração, a distribuição das frequências percentuais relativas aos índices de apoptose e de proliferação celular em estroma e glândula das 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide e das 20 mulheres sem endometriose encontra-se representada na Figura 18.

IA

Glândula

IP

Glândula

■ Grupo experimental ■ Grupo-controle

Figura 18. Representação gráfica das frequências dos Índices de Apoptose (IA) e de Proliferação (IP) encontrados em estroma e glândula de tecido de endometriose de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide e de endométrio de 20 pacientes sem endometriose. [Os índices de 0 a 8 se referem aos índices mínimo e máximo encontrados nesta amostra.]

Na sequência, foram estabelecidas e comparadas as médias e os desvios-padrão do IRC (produto do índice de proliferação dividido pelo índice de apoptose) em estroma e glândula de ambos os grupos.

Não foi observada diferença significativa nas médias do IRC, quando comparados estroma e glândula tanto nas pacientes com endometriose do reto-sigmoide ($p = 0,992$) quanto nas pacientes sem endometriose ($p = 0,744$) (Tabela 6). Por outro lado, os IRC médios foram significativamente mais baixos entre as mulheres com endometriose do reto-sigmoide, comparadas às mulheres do grupo-controle, tanto em estroma ($p = 0,032$) quanto em glândula ($p = 0,007$), conforme Figura 19.

Tabela 6. Médias dos Índices de Renovação Celular (IRC) em estroma e glândula de tecido de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide (grupo experimental) e em tecido de endométrio de 20 pacientes sem endometriose (grupo-controle).

Grupo experimental		Grupo-controle	
Estroma	Glândula	Estroma	Glândula
$0,9 \pm 0,9$	$0,9 \pm 1,2$	$2,4 \pm 2,1$	$2,2 \pm 1,6$
$p = 0,922$		$p = 0,744$

Figura 19. Médias e desvios-padrão dos Índices de Renovação Celular (IRC) em estroma e glândula de tecido de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide (grupo experimental) e em tecido de endométrio de 20 pacientes sem endometriose (grupo-controle).

A seguir, buscou-se determinar eventuais correlações do IP, do IA e do IRC com os dados clínicos das pacientes, com as características da lesão e com o estadiamento da doença.

De modo geral, no grupo de pacientes com endometriose do reto-sigmoide não foi evidenciado grau significativo de relacionamento dos sintomas clínicos com o IP nem com o IA (Tabela 7). Ressalte-se que, uma vez que todas as pacientes com endometriose do reto-sigmoide (100%) relataram dismenorreia, essa análise não foi possível com esse sintoma clínico.

Tabela 7. Coeficientes de correlação (CC) e significância estatística (*p*) na análise do grau de relacionamento entre variáveis clínicas e os IP (índice de proliferação) e IA (índice de apoptose) em glândula e estroma de lesões de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide.

Variáveis clínicas	IP				IA			
	Estroma		Glândula		Estroma		Glândula	
	CC	<i>p</i>	CC	<i>p</i>	CC	<i>p</i>	CC	<i>p</i>
Idade	0,05	0,969	-0,03	0,820	0,08	0,513	0,05	0,654
Alterações intestinais cíclicas	-0,02	0,897	0,11	0,407	0,22	0,079	0,08	0,508
Dor pélvica crônica	-0,11	0,411	-0,17	0,188	0,13	0,311	0,03	0,802
Dispareunia de profundidade	0,09	0,489	0,126	0,337	0,09	0,489	0,01	0,921
Alterações urinárias cíclicas	-0,29	0,064	-0,20	0,091	-0,07	0,611	-0,04	0,732

Por outro lado, quando analisadas as características das lesões, o IP em glândula mostrou-se positivamente correlacionado com o número de lesões, ou seja, quanto maior o número de lesões, maior o índice de positividade para TOP2A (Tabela 8). Não houve grau de relacionamento significativo entre os IP e IA e as demais características da lesão.

Tabela 8. Coeficientes de correlação (CC) e significância estatística (*p*) na análise do grau de relacionamento entre características da lesão e os IP (índice de proliferação) e IA (índice de apoptose) em estroma e glândula de lesões de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide.

Características da lesão	IP				IA			
	Estroma		Glândula		Estroma		Glândula	
	CC	<i>p</i>	CC	<i>p</i>	CC	<i>p</i>	CC	<i>p</i>
Número de lesões	0,07	0,568	0,35	0,006	-0,16	0,909	0,14	0,272
Tamanho das lesões	0,19	0,143	0,20	0,150	-0,19	0,150	0,06	0,670
Camadas acometidas	-0,14	0,293	-0,03	0,825	-0,06	0,654	-0,05	0,727
Classificação histológica	0,03	0,849	-0,05	0,704	-0,09	0,513	0,03	0,802

Não foi observada correlação significativa entre os IP e IA e o estadiamento da doença (Tabela 9).

Tabela 9. Coeficientes de correlação (CC) e significância estatística (p) na análise do grau de relacionamento entre o estadiamento da doença e os IP (índice de proliferação) e IA (índice de apoptose) em estroma e glândula de lesões de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide.

	IP				IA			
	Estroma		Glândula		Estroma		Glândula	
	CC	p	CC	p	CC	p	CC	p
Estadiamento da doença	-0,13	0,329	0,07	0,611	-0,04	0,784	-0,11	0,381

Quando a análise dos dados visou à verificação do grau de relacionamento entre variáveis clínicas e IRC (Tabela 10), não foi estabelecido grau de relacionamento significativo.

Tabela 10. Coeficientes de correlação (CC) e significância estatística (p) na análise do grau de relacionamento entre variáveis clínicas e o IRC (índice de renovação celular) em glândula e estroma de lesões de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide.

Variáveis clínicas	IRC			
	Estroma		Glândula	
	CC	p	CC	p
Idade	0,12	0,510	0,13	0,477
Alterações intestinais cíclicas	-0,03	0,874	0,02	0,912
Dor pélvica crônica	-0,19	0,299	0,04	0,825
Dispareunia de profundidade	0,09	0,320	0,10	0,579
Alterações urinárias cíclicas	-0,27	0,126	-0,15	0,354

Já na verificação do grau de relacionamento entre características da lesão de endometriose do reto-sigmoide e o IRC (Tabela 11), foi evidenciada correlação positiva significativa entre o tamanho das lesões e o IRC no estroma ($p = 0,006$), bem como entre o número de lesões e o IRC em glândula ($p = 0,003$).

Tabela 11. Coeficientes de correlação (CC) e significância estatística (p) na análise do grau de relacionamento entre características da lesão e o IRC (índice de renovação celular) em glândula e estroma de lesões de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide.

Características da lesão	IRC			
	Estroma		Glândula	
	CC	p	CC	p
Número de lesões	-0,01	0,478	0,49	0,003*
Tamanho das lesões	0,47	0,006*	0,30	0,089
Camadas acometidas	-0,04	0,823	0,19	0,289
Classificação histológica	-0,08	0,647	-0,20	0,264

Não foi observada correlação significativa entre o IRC e o estadiamento da doença (Tabela 12).

Tabela 12. Coeficientes de correlação (CC) e significância estatística (p) na análise do grau de relacionamento entre o estadiamento da doença e o IRC (índice de renovação celular) em glândula e estroma de lesões de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide.

	IRC			
	Estroma		Glândula	
	CC	p	CC	p
Estadiamento da doença	-0,18	0,329	0,13	0,470

Por fim, nos estudos imuno-histoquímicos, não foi observada positividade para a proteína p53 nem para a oncoproteína c-erB2 nas pacientes dos dois grupos de estudo.

5. DISCUSSÃO

Nossos estudos sobre os conhecimentos diagnósticos, clínicos e terapêuticos dos implantes intestinais de tecido endometriótico e sobre a sua relação com processos neoplásicos evidenciaram a necessidade de maior compreensão do caráter benigno dessa doença e do seu eventual potencial para malignidade (Bassi et al., 2009).

Sabe-se que a endometriose é uma lesão de natureza benigna, mas com caráter invasivo. Diferentes estudos já relataram a sua correlação com fenômenos neoplásicos devido ao seu potencial proliferativo e à sua monoclonalidade (Sampson, 1927; Nilbert et al., 1995; Erzen e Kovacic, 1998; Stern et al., 2001; Van Gorp et al., 2004; Melin et al., 2006). É necessário, contudo, esclarecer qual a influência de condições da cinética desse tecido e de seus compartimentos histológicos sobre a difusão da doença nos tecidos distantes de seu sítio primário uterino, assim como qual a influência de oncoproteínas-chave para o controle do ciclo celular.

Foi nesse sentido que o presente trabalho visou realizar estudo anátomo-clínico da endometriose profunda e correlacionar os achados com dados histológicos e moleculares na tentativa de contribuir para a compreensão da influência de aspectos do ciclo celular no tecido ectópico no que se refere à cinética de renovação celular.

Na amostra composta de 60 pacientes com endometriose do reto-sigmoide pudemos observar que a maioria delas apresentava os sinais e

sintomas que classicamente caracterizam o quadro clínico da endometriose (Abrão et al., 1999), especialmente representados por dismenorreia (100,0%), alterações intestinais cíclicas (83,3%), dor pélvica crônica (81,7%), dispareunia de profundidade (81,7%) e alterações urinárias cíclicas (15,0%). Alguns desses sintomas (dismenorreia, alterações intestinais cíclicas e dispareunia de profundidade) também foram relatados por algumas das pacientes sem endometriose, mas com frequência significativamente menor.

Na maioria dos casos de endometriose do reto-sigmoide (65,0%), as lesões infiltravam até a camada muscular interna; 20 lesões acometiam ainda a submucosa (28,3%) ou a mucosa (5,0%). Em média, essas pacientes apresentavam $1,3 \pm 0,6$ lesões medindo $26,9 \pm 12,3$ mm.

Embora tenhamos adotado critério que considera como endometriose profunda infiltrativa de reto-sigmoide com indicação para ressecção de segmento intestinal a lesão infiltrando até pelo menos a camada muscular interna da parede intestinal (Cornillie et al., 1990), em um caso (1,7%) o exame histológico evidenciou que a lesão estava comprometendo a camada muscular externa, o que poderia evitar a ressecção segmentar, apesar de a imagem ultrassonográfica ter sugerido comprometimento da camada muscular interna. Os exames ultrassonográficos, portanto, foram precisos em 98,3%, corroborando o papel adjuvante imprescindível desse exame na avaliação diagnóstica das lesões endometrióticas implantadas no intestino (Abrão et al., 2003a; Abrão et al., 2004; Gonçalves et al., 2009).

Com relação ao estudo do tecido da endometriose propriamente dito, é importante lembrar que a identificação de células morfológicamente altera-

das constituem o método-padrão para o estudo quantitativo da apoptose, mesmo quando essas alterações morfológicas são identificadas com o auxílio de métodos para a detecção de corpos apoptóticos com corantes fluorescentes e para a detecção de DNA fragmentado pela marcação das extremidades dos segmentos da molécula (Gavrieli et al., 1992; Parton et al., 2001; Holubec et al., 2005).

O equilíbrio entre proliferação celular (aqui determinado pela expressão de TOP2A) e apoptose tem papel fundamental na homeostasia tecidual. Alterações não fisiológicas nesse equilíbrio, geralmente secundárias a alterações nos genes envolvidos na regulação do ciclo celular, tendem a resultar em acúmulo de células no tecido, queira por aumento no número de células em proliferação, queira por diminuição no número de células que entram em apoptose possibilitando o crescimento do tecido.

Ao acessarmos as características biológicas da lesão de endometriose no que se refere à cinética celular, podemos chamar a atenção para os seguintes achados:

a) Não houve diferenças entre o índice de apoptose, o índice de proliferação e o índice de renovação celular, quando comparamos o componente glandular e o componente estromal da lesão endometriótica, caracterizando crescimento homogêneo desse tecido.

b) Houve correlação significativa positiva entre o número de lesões e IP e IRC em glândula, e entre o tamanho das lesões e IRC em estroma, o que representa achado ainda não observado anteriormente em endometriose do reto-sigmoide.

Com relação ao IP e IRC em glândula terem sido positivamente correlacionados com o número de lesões, não encontramos na literatura pertinente informações sobre a possibilidade de haver mais de uma lesão de endometriose em um mesmo segmento do intestino. Pode-se, contudo, especular que facilitadores dessas múltiplas lesões ectópicas de endometriose devem incluir aspectos imunológicos e humorais das pacientes, bem como a propensão de determinados sítios orgânicos a favorecer a instalação e a manutenção da doença.

O achado de correlação positiva significativa entre os IRC estromais e o tamanho da lesão parece ratificar que lesões maiores seriam mais infiltrativas, preferencialmente pela via estromal (Jones et al., 1998), especialmente se considerarmos que essa correlação não foi encontrada nos IRC glandulares.

Encontramos frequência de evidências de proliferação celular menor em estroma e glândula de lesões de endometriose do reto-sigmoide em relação às amostras de endométrio de pacientes sem endometriose. De toda forma, considerando apenas o grupo experimental, esses índices foram bastante altos. Os índices de renovação celular também se mostraram significativamente mais baixos nas pacientes com endometriose do que no grupo-controle.

Pudemos observar evidências de apoptose em 50% das amostras estromais e em 55% das amostras glandulares nas lesões de endometriose que não foram diferentes dos achados do grupo-controle (respectivamente, 60,0% e 55,0%).

Diferentes autores relataram redução significativa de apoptose no componente glandular (Watanabe et al., 1997; Gebel et al., 1998; Dmowski et al., 2001; Harada et al., 2004) ou no estroma (Jones et al., 1998; Ilad et al., 2004) de tecido endometriótico ectópico. Jones et al. (1998) reportaram, inclusive, a ausência de apoptose nas células estromais de tecido ectópico. Alguns trabalhos sugerem que, nas células glandulares de tecido endometriótico ectópico há perda da variabilidade cíclica característica da apoptose encontrada no tecido eutópico (Watanabe et al., 1997; Dmowski et al., 2001). Ilad et al. (2004) sugeriram que irregularidades no processo apoptótico das células estromais teriam papel crucial no desenvolvimento da endometriose.

Há autores que defendem que não há diferenças na apoptose de endométrio eutópico ou ectópico em pacientes com ou sem endometriose, e que o tema ainda carece de evidências que o esclareçam (Aguiar, 2007; Hassa et al., 2009). Nossos achados parecem ratificar essa assertiva, pelo menos no que tange à comparação entre lesões de endometriose e tecido de endométrio de mulheres sem a doença.

Em 2007, Aguiar demonstrou índices de proliferação celular significativamente aumentados nos casos de endometriose, principalmente no componente estromal do endométrio eutópico ou no componente glandular do implante ectópico. Também já foi observada tendência acentuada de maior proliferação celular em lesões ectópicas induzidas em modelos animais (Rosa e Silva et al., 2010).

Estudos defendem que a característica invasiva do endométrio em sítio ectópico resulta da associação entre a morte celular reduzida e proliferação

celular aumentada (Johnson et al., 2005; Braun et al., 2007). Na tentativa de confirmação dessa hipótese, Gonzáles-Ramos et al. (2008) induziram a redução da proliferação celular e o aumento de apoptose em modelo animal de endometriose, e observaram que o desenvolvimento inicial da doença se mostrou significativamente diminuído. Os nossos resultados sugerem que o tecido com endometriose cresce de forma homogênea, o que é ratificado pelo fato de o IP e o IRC terem sido correlacionados positivamente com tamanho e número de lesões.

Diferentes autores vêm associando os graus de expressão da TOP2A com diferentes tumores (Faggad et al., 2009; Sheen-Chen et al., 2010), especialmente com aqueles mais agressivos e altamente proliferativos (Helleman et al., 1995; Deweese et al., 2008), e nosso estudo ratificou que o caráter proliferativo da endometriose pode ser decorrente de alterações na proliferação celular, mas não de defeito na morte celular programada.

É fato que tanto a redução de apoptose quanto o aumento da proliferação celular alteram o equilíbrio da cinética celular, e que essa alteração desempenha papel sabidamente crucial no desenvolvimento de neoplasias (McDonnel, 1993; Mommers et al., 1999). Talvez esteja aí uma das razões que explicam o fenótipo neoplásico da endometriose e a possibilidade de malignização de endometriose intestinal (Falco et al., 2007).

Embora já tenha sido relatada correlação inversa entre apoptose reduzida e a gravidade da endometriose (Dmowski et al., 2001; Harada et al., 2004), nossos dados não permitiram relacionar o IA com qualquer outra variável clínica.

Encontramos correlação positiva entre o tamanho da lesão e o IRC em estroma. Esses achados permitem inferir, a exemplo de Ilad et al. (2004), que o componente estromal desempenha papel predominante no crescimento do tecido endometriótico. A diferença é que Ilad et al. (2004) atribuíram o desenvolvimento da endometriose às irregularidades no processo apoptótico nas células estromais, o que, na interpretação de Harada et al. (2004), estaria diretamente relacionado com o aumento no número de receptores de estrógenos expressos no estroma ectópico. Nossos dados, por outro lado, o atribuem a alterações no índice de renovação celular no estroma, por razões a serem esclarecidas.

Neste estudo não foi observada positividade para p53 nem para c-erB2 nas lesões analisadas, sugerindo que a atividade dos oncogenes que codificam essas proteínas não está alterada. Assim, no nosso material, podemos concluir que tais oncoproteínas não influenciaram a cinética celular do tecido endometriótico implantado na parede intestinal.

Schneider et al. (1998) não encontraram expressão de p53 em 16 amostras de tecido endometriótico. Prefumo et al. (2003), por sua vez, encontraram expressão aumentada tanto de p53 quanto de c-erB2 em 13 casos de adenocarcinoma endometriode ovariano associado com endometriose.

Embora tenham encontrado positividade focal para proteína p53 no componente glandular do tecido de endometriose, Nakayama et al. (2001) não encontraram mutações gênicas. Segundo esses autores, essa ausência de mutações gênicas em lesões com endometriose não é achado inesperado, principalmente se considerarmos que, mesmo em carcinomas de ová-

rios, essas mutações não são particularmente frequentes, e, quando estão presentes, ocorrem tardiamente no processo de carcinogênese ovariana.

Em estudo envolvendo 410 casos de câncer epitelial de ovários e 521 casos de endometriose (Saínz de La Cuesta et al., 2004), foram destacados grupos compostos de 17 casos (4,1%) de câncer associado com endometriose; seis casos de endometriose atípica; 17 casos de endometriose; e sete casos de endométrio saudável para análise imuno-histoquímica para avaliação da expressão de oncoproteínas. Expressão aumentada de p53 foi detectada em 82,4% dos casos de câncer associado com endometriose e em todos os casos de endometriose atípica. Em apenas dois casos (11,8%) de endometriose e em nenhuma amostra de tecido endometrial normal foi observado p53 mutante. Não houve diferenças entre os grupos na expressão de c-erB2. Esses achados sugerem que a expressão aumentada de p53 possa ser forte fator preditor de endometriose com potencial pré-maligno, o que não significa dizer que toda lesão endometriótica tenha esse potencial.

Coronado Martín et al. (2007) realizaram análise imuno-histoquímica de 124 amostras de tecido de câncer epitelial de ovário e de 30 amostras de tecido ovariano normal. Não foi identificada expressão aumentada de p53 nem de c-erB2 em nenhuma das amostras de tecido normal. Expressão de c-erB2 foi detectada em 24,2% dos casos de câncer ovariano, e foi significativamente correlacionada com estadio avançado da doença e com menores taxas de sobrevida, tanto geral quanto livre da doença.

Em resumo, pudemos constatar que o índice de proliferação celular em glândula de tecido de endometriose no reto-sigmoide se correlaciona positi-

vamente com o número de lesões nesse segmento intestinal, o que poderia nos reportar às teorias propostas por Meyer (1919) e Sampson (1927) sobre implantes continuados do endométrio em cavidade abdominal, associados com algum tipo de favorecimento do microambiente relacionado ao hospedeiro, que exerceria papel importante nesse controle e no aparecimento de múltiplas lesões, abrindo novas perspectivas de estudo em relação a esses fatores.

A mesma correlação positiva foi evidenciada entre o índice de renovação celular e o número de lesões (em glândula) e o tamanho da lesão (em estroma).

Por fim, nossos achados sugerem que os fatores que regulam o crescimento da endometriose que compromete a parede do reto-sigmoide provavelmente não sofram influências das oncoproteínas p53 e c-erbB-2, corroborando com os conhecimentos que se têm até os dias de hoje sobre o caráter benigno da endometriose, embora mantendo o desafio de conhecer a razão por que uma doença benigna apresenta, tal qual uma neoplasia maligna, comportamento agressivo e invasivo aos diversos órgãos, principalmente quando afeta o segmento intestinal.

CONCLUSÕES

Este estudo permitiu as seguintes conclusões:

- Foi evidenciada positividade para apoptose e topoisomerase II-alfa tanto em lesões de endometriose do reto-sigmoide quanto em tecido de endométrio eutópico de mulheres sem endometriose.
- Evidências de proliferação celular foram menos frequentes e índices de proliferação e de renovação celular foram mais baixos em amostras de lesões de endometriose do reto-sigmoide em relação às amostras de endométrio de mulheres sem endometriose.
- Não houve correlação entre índices positivos para apoptose, proliferação celular e renovação celular e os sintomas clínicos referidos pelas pacientes com endometriose do reto-sigmoide.
- O número de lesões apresentou correlação positiva com os índices de proliferação e de renovação celular na glândula.
- O tamanho das lesões apresentou correlação positiva com os índices de renovação celular no estroma.
- A classificação histológica das lesões não foi correlacionada com os índices de apoptose, proliferação ou renovação celular.
- Não houve expressão das oncoproteínas p53 e c-erB2 na endometriose infiltrativa do reto-sigmoide.

ANEXOS

ANEXO 1. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14/03/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 1328/06, intitulado: "COMPORTAMENTO DA ENDOMETRIOSE INTESTINAL SEGUNDO A PLOIDIA DE DNA" apresentado pelo Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX, 2, letra "c")

Pesquisador (a) Responsável: Prof. Dr. Maurício Simões Abrão

Pesquisadores Executantes: Marco Antonio Bassi

CAPPesq, 14 de março de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovidio Freire de Campos, 225, 8º andar - CEP 054 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30694442 - Fax: 011 - 3069 4492 - e-mail: cappel@hcfmusp.br / secretariadocappesq2@hcfmusp.br

ANEXO 2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ASSINADO PELAS PACIENTES COM ENDOMETRIOSE DO RETO-SIGMOIDE.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 Ë SÃO PAULO - BRASIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :..... SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. **TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:** Pesquisa de ploidia de DNA, apoptose, p53, c-erBB 2 e topoisomerase II alfa em lesão de endometriose infiltrativa de intestino.
2. **PESQUISADOR:** Dr. Marco Antonio Bassi
3. **CARGO/FUNÇÃO:** Pós-Graduando do Departamento da Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 69.806
4. **UNIDADE DO HCFMUSP:** Disciplina de Ginecologia HCFMUSP
5. **AValiação DO RISCO DA PESQUISA:**
SEM RISCO ☒ RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐
(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

6. **DURAÇÃO DA PESQUISA :** 05 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa : A senhora está sendo admitida nesta pesquisa, por ter sido submetida a tratamento cirúrgico para endometriose profunda infiltrativa, com retirada de um pequeno segmento intestinal, e (ou) de fragmentos de outros órgãos e tecidos. Nesta doença, o endométrio, que é a parte do útero que se desprende e sangra durante a menstruação, pode crescer fora do útero, em outros lugares, como os ovários, o tecido que reveste o abdome internamente (chamado de peritônio) e outras localizações como o intestino, bexiga e outros órgãos. Para o tratamento da sua doença, a senhora foi submetida a uma cirurgia e durante o ato cirúrgico fragmentos de tecido foram retirados por apresentarem endometriose. Estes fragmentos foram enviados para exame anátomo-patológico (no qual se utiliza um microscópio para avaliar cortes muito finos dos tecidos que foram retirados da senhora). Para obter um maior conhecimento clínico e científico das doenças, o corpo clínico deste hospital (médicos e pesquisadores) desenvolvem pesquisa clínica e científica. Por esta pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. O objetivo desta pesquisa é analisar pequenos fragmentos do tecido doente retirados na cirurgia, sem comprometer o diagnóstico da doença para que sejam utilizados em estudos para se conhecer melhor as causas da doença e novas possibilidades de diagnóstico e tratamento.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: A senhora foi submetida a uma videolaparoscopia, que é um tipo de cirurgia na qual são realizados 3 ou 4 pequenos cortes na barriga e os médicos realizaram a cirurgia observando o interior da barriga em uma televisão. Durante a cirurgia, o seu médico removeu o tecido doente. Este tecido foi enviado para a análise final do diagnóstico, por um médico patologista. O diagnóstico foi confirmado pela análise destes matérias e os mesmos estão arquivados no laboratório de patologia clínica. Agora precisamos utilizar uma diminuta fração de todo este material que já foi analisado, e, que agora esta arquivado no laboratório de patologia, para podermos realizar a pesquisa que estamos propondo

3. Desconfortos e riscos esperados: Não haverá nenhum desconforto ou risco para a realização desta pesquisa, uma vez que serão utilizados diminutos fragmentos de material já coletados durante a cirurgia que a sra. realizou, e que estão guardados no laboratório de patologia clínica,

4. Benefícios que poderão ser obtidos: com esta pesquisa da qual a senhora está participando, tentamos descobrir se os achados encontrados poderão ajudar futuras pacientes no que tange ao seu tratamento. Concordando com o uso deste material, do modo descrito, é necessário esclarecer que você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o fragmento da peça para pesquisa, sua decisão não influenciará, de modo algum, o seu tratamento. Salientamos que você tem a liberdade de retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa sem prejuízos a seu cuidado e que você terá direito de acesso sobre os eventuais resultados desta pesquisa e toda assistência necessária caso assim o desejar. Os pesquisadores estarão à sua disposição para quaisquer esclarecimentos e no endereço abaixo especificado

5. Custos: a senhora não terá custos ao participar do estudo.

6. Tratamento alternativo: não existem diferenças nos tratamentos realizados em virtude de sua participação ou não neste estudo.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

Sua participação no presente estudo é voluntária. A senhora pode optar por não participar ou interromper sua participação no estudo a qualquer momento, sem sanção nem perda de benefícios aos quais pudesse ter direito. Se decidir interromper antes de terminar o estudo, será solicitado a voltar ao consultório/hospital para uma visita final.

Havendo interesse subsequente da paciente os pesquisadores se comprometem a descartar as amostra colhidas imediatamente após notificação oficial da paciente ou de seus representantes legais.

O pesquisador assegura TOTAL sigilo e privacidade quanto aos dados armazenados e obtidos com este estudo.

O **Dr. Marco Antonio Bassi** pode retirar a senhora do estudo sem o seu consentimento por qualquer uma das seguintes razões: a) com base em critérios para melhorar seu atendimento médico;

b) se a senhora deixar de seguir o esquema do estudo; c) desenvolvimento de efeitos adversos graves.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

O Dr. Marco Antonio Bassi estará à sua disposição, a qualquer momento, para discutir as dúvidas que a senhora possa ter a respeito de sua endometriose, este estudo e sua participação. O consultório do Dr. Marco Antonio Bassi fica na Rua Albuquerque Lins, 537 cj. 112 e o número do telefone de seu consultório é (11) 3825-2262, durante o horário comercial ou pelo pager (11) 4196-7060, código BASSI após este horário e durante os finais de semana ou feriados.

O contato com o Dr. Marco Antonio Bassi ou um de seus auxiliares em caso de emergência pode ser feito através deste número. Se o desenho do estudo ou o uso da informação forem alterados ou se surgir alguma descoberta significativa durante o estudo que possam afetar seu desejo em participar, a senhora será informada e será obtido novamente o seu consentimento.

Se tiver quaisquer dúvidas sobre seus direitos como indivíduo de pesquisa ou queixas referentes a este estudo de pesquisa, a senhora deverá telefonar para:

*Dr. Marco Antonio Bassi
End.: Rua Albuquerque Lins, 537 . cj. 112 . São Paulo . Capital
Tel. 11- 3825-2262 . cep. 05088-000*

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Ao assinar este termo de consentimento livre e esclarecido, reconheço que li e compreendi a informação precedente descrevendo este estudo. Minhas dúvidas foram satisfatoriamente esclarecidas e estou assinando este termo de consentimento livre e esclarecido indicando meu desejo de participar. Compreendo que receberei uma cópia assinada deste termo.

Ao assinar este termo de consentimento livre e esclarecido, não abdiquei de nenhum de meus direitos legais aos quais eu pudesse fazer jus como participante de um estudo de pesquisa.

São Paulo, de de .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(crimbo ou nome Legível)

ANEXO 3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO ASSINADO PELAS PACIENTES SEM ENDOMETRIOSE DO RETO-SIGMOIDE (GRUPO-CONTROLE).

É necessário que a senhora leia atentamente e entenda o estudo antes de assinar este documento. Por isso, se não entender qualquer palavra ou informação, por favor, peça todas as explicações necessárias para a sua compreensão. A senhora não deve aceitar a participação sem entender totalmente os objetivos e a sua importância no estudo. Caso tenha dificuldade para a leitura deste documento, a senhora pode pedir para que o pesquisador leia em voz alta na frente de testemunhas, e depois a senhora dirá se entendeu e se quer participar da pesquisa. Se não puder assinar o documento, será necessário que as testemunhas assinem pela senhora.

NATUREZA E OBJETIVO DO ESTUDO

O endométrio é o tecido que reveste a parte interna do útero e é, também, a parte do útero que sangra durante a menstruação. Em algumas mulheres, o tecido endometrial pode crescer fora do útero, em outros lugares, como os ovários, o intestino, a bexiga, o peritônio - tecido que reveste a parte interna do abdômen. A essa doença se dá o nome de endometriose, que pode causar dor às vezes bastante intensa, sangramentos, alterações intestinais e urinárias desconfortáveis e dificuldade para engravidar ou infertilidade. O nosso objetivo nesta pesquisa composta de diferentes estudos relativos à endometriose é obter maior conhecimento científico da doença endometriose. Para entender por que e como ocorre a endometriose, precisamos comparar amostras de tecidos de pacientes com endometriose com amostras de endométrio de pacientes saudáveis sem endometriose. Por isso, estamos convidando a senhora para participar, se quiser, desta pesquisa que deverá permitir que possamos conhecer um pouco melhor os mecanismos da doença e, assim, oferecer novas possibilidades de diagnóstico mais rápido e tratamento mais eficaz para as pacientes com endometriose. Ressaltamos que o material colhido será utilizado nos diferentes estudos que compõem a pesquisa maior intitulada **Í ENDOMETRIOSE: BASES MOLECULARES DA RESPOSTA IMUNOLÓGICAÍ**.

PROCEDIMENTO DO ESTUDO

Para que a senhora possa decidir se quer ou não quer aceitar este nosso convite para participar da pesquisa, esclarecemos, desde já, que, qualquer que seja a sua decisão, o procedimento cirúrgico de laqueadura para o qual a senhora está sendo admitida neste hospital será realizado exatamente da forma como aprovada e combinada com a senhora, sem nenhuma modificação e sem qualquer interferência de sua resposta ao nosso convite. Por isso, a senhora tem toda a liberdade de recusar ao convite. Esclarecemos, também, que o estudo consiste de três procedimentos: (1) coleta de 5 ml de fluido peritoneal (um líquido que normalmente existe no interior de sua cavidade abdominal); (2) coleta de sangue na quantidade aproximada de 20 ml, que é uma quantia considerada pequena e sem riscos para sua saúde; e (3) retirada de um pequeno fragmento de endométrio do seu útero. Esses procedimentos só serão realizados quando a senhora já estiver devidamente preparada para a sua cirurgia, inclusive sob anestesia, de modo que a senhora não sentirá qualquer desconforto. A obtenção desses materiais não causará nenhum risco adicional para a sua cirurgia nem acarretará aumento no tempo da operação. Estes materiais coletados serão identificados por códigos formados por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade não serão reveladas.

RISCOS ESPERADOS

A senhora já deve ter sido informada de que o procedimento cirúrgico ao qual a senhora será submetida poderá trazer alguns desconfortos, e asseguramos que os procedimentos do estudo para o qual a senhora está sendo convidada não apresentará nenhum risco adicional. Para a coleta do fluido peritoneal, um pequeno instrumento que permite a aspiração do líquido será usado na mesma incisão que será feita para a cirurgia de laqueadura. Para a coleta do fragmento de endométrio (o tecido que reveste a parede interna do útero), será utilizado um instrumento chamado cureta de pipele, que é um instrumento plástico estéril e flexível, parecido com um canudinho plástico, que permite que se aspire uma pequena parte da parede interna do útero, sem a necessidade de qualquer outra incisão (corte). Durante a coleta de fluido peritoneal e durante a coleta de fragmento do endométrio, os riscos de ocorrer algum evento adverso são mínimos. Depois da cirurgia, esses procedimentos de estudo

podem ocasionar, em número pequeno de pacientes, algum corrimento escuro ou pequeno sangramento, como ocorre no final de uma menstruação. Em poucos casos, também pode ocorrer um desconforto doloroso de pequena intensidade e, em raríssimos casos, pode haver risco de perfuração uterina, porém essa complicação nunca foi descrita com a utilização desse método. Essas ocorrências, porém, geralmente desaparecem em no máximo até um dia após o procedimento. Quanto à coleta de sangue, no local da punção da veia para a coleta, podem ocorrer sangramentos que causem hematomas, que podem causar dor, mas não trarão nenhum prejuízo futuro, e que geralmente desaparecem em alguns dias.

BENEFÍCIOS

- Os resultados da pesquisa sobre a qual a senhora está sendo esclarecida e para a qual a senhora está sendo convidada a participar não trarão para a senhora nenhum benefício direto nem qualquer direito financeiro. Por outro lado, esses resultados ajudarão a compreender melhor a doença endometriose e permitirão que desenvolvamos tratamentos mais eficientes para as mulheres que possuem essa doença.

- Sua participação é **voluntária** e você terá tempo suficiente para decidir se quer ou não participar dele. Caso tenha dúvidas sobre algum risco relacionado à sua participação, a senhora deve perguntar quantas vezes forem necessárias até sentir-se confortável para decidir. Se decidir participar, poderá retirar a sua autorização a qualquer momento se assim desejar, sem nenhum prejuízo para o seu acompanhamento clínico.

- O profissional poderá retirá-la do estudo a qualquer momento, caso julgue que é a melhor opção para a senhora.

- Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Hospital Heliópolis. Qualquer dúvida sobre os seus direitos de participante na pesquisa poderão ser esclarecidos diretamente com o dr. Odilon Victor Porto Denardin, no endereço Rua Cônego Xavier, 276m 10º andar, Sacomã, São Paulo, SP, ou pelo telefone (11) 2215-1100.

- Caso a senhora apresente algum problema decorrente da sua participação direta no estudo, a senhora deve procurar o dr. Maurício Simões Abrão, em qualquer período, no telefone (11) 5180-3344.

CONFIDENCIALIDADE DOS REGISTROS

Nesse estudo somente suas iniciais e um número especial do estudo identificarão a senhora. Caso os resultados do estudo sejam publicados ou apresentados em congressos médicos ou reuniões científicas, sua identidade não será revelada em hipótese alguma.

TERMO DE PARTICIPAÇÃO E ASSINATURA

Aceito participar da pesquisa **ÍNDOMETRIOSE: BASES MOLECULARES DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA**, e declaro que li e não tenho nenhuma dúvida sobre os termos de esclarecimento acima. Autorizo, também, o uso das informações obtidas na pesquisa em publicações em revistas médicas e apresentações em congressos, desde que meus dados pessoais sejam mantidos em sigilo.

Nome completo do Paciente

_____ Data: _____

Assinatura do Paciente

Nome completo do Médico responsável

_____ Data: _____

Assinatura e carimbo de Médico responsável

Nome completo da Testemunha

_____ Data: _____

Assinatura da Testemunha

ANEXO 4.

DADOS CLÍNICOS DE 60 PACIENTES COM

ENDOMETRIOSE DO RETO-SIGMOIDE.

INICIAIS	IDADE	RAÇA	DISME- NORREIA	DOR PÉLVICA CRÔNICA	DISPAREUNIA DE PROFUNDIDADE	ALTERAÇÕES URINÁRIAS CÍCLICAS	ALTERAÇÕES INTESTINAIS CÍCLICAS
AAG	32	BRANCA	s	s	s	n	s
ACDSG	27	BRANCA	s	s	s	n	s
ACH	45	BRANCA	s	s	s	n	s
ADST	33	BRANCA	s	s	n	n	s
APDC	22	BRANCA	s	s	s	s	s
APNDLP	29	BRANCA	s	s	s	n	s
CDF	32	BRANCA	s	s	s	n	s
CFRE	26	BRANCA	s	s	n	n	s
CGIM	35	BRANCA	s	s	s	n	n
CMMC	32	BRANCA	s	s	n	n	s
CMSM	40	BRANCA	s	n	s	s	s
CSFL	30	BRANCA	s	s	s	n	s
ECR	41	BRANCA	s	n	n	n	s
EMM	44	BRANCA	s	s	s	n	s
FDSDNEN	26	BRANCA	s	s	s	n	s
FGAF	25	BRANCA	s	n	s	n	n
FNA	33	AMARELA	s	s	s	n	s
FOSDO	31	BRANCA	s	n	s	s	s
FRB	38	BRANCA	s	s	s	n	s
FSMC	34	BRANCA	s	s	s	n	s
GASR	39	NEGRA	s	s	s	n	s
GNB	34	BRANCA	s	s	s	n	s
GRB	31	BRANCA	s	s	s	n	s
ICB	37	BRANCA	s	s	s	n	s
IGPF	43	BRANCA	s	s	s	s	s
JABB	34	BRANCA	s	s	s	n	n
JYHN	34	AMARELA	s	n	s	n	s
KRM	27	BRANCA	s	s	s	n	n
LFML	22	BRANCA	s	s	s	n	s
LGODSS	38	BRANCA	s	s	s	n	s
LSBDM	37	NEGRA	s	s	n	n	s
MAFR	29	BRANCA	s	s	n	n	s
MAMC	40	BRANCA	s	n	n	n	n
MARP	34	BRANCA	s	s	n	n	s
MBL	40	NEGRA	s	s	s	n	s
MCAF	44	BRANCA	s	s	s	s	s
MCDPLM	30	BRANCA	s	s	s	s	s
MDLAS	40	BRANCA	s	s	s	n	s
MFM	30	NEGRA	s	s	s	n	s
MGRM	27	BRANCA	s	s	s	n	S
MHFG	45	BRANCA	s	s	s	n	n
MIAS	39	NEGRA	s	n	s	n	s

INICIAIS	IDADE	RAÇA	DISME- NORREIA	DOR PÉLVICA CRÔNICA	DISPAREUNIA DE PROFUNDIDADE	ALTERAÇÕES URINÁRIAS CÍCLICAS	ALTERAÇÕES INTESTINAIS CÍCLICAS
MN	34	AMARELA	s	s	s	n	s
MZLB	42	BRANCA	s	n	n	n	n
NOKF	32	AMARELA	s	s	s	n	s
NSDN	30	BRANCA	s	s	s	n	s
PRR	30	BRANCA	s	n	n	n	n
RASMM	34	BRANCA	s	s	s	n	s
RCSPS	38	NEGRA	s	s	s	s	s
RDSS	31	BRANCA	s	s	s	n	s
RMF	31	BRANCA	s	n	s	n	n
SAAS	40	BRANCA	s	s	s	n	s
SAP	32	BRANCA	s	s	s	n	s
SDMNB	29	BRANCA	s	s	n	s	s
SFHT	41	BRANCA	s	n	s	n	s
SHBS	33	BRANCA	s	s	s	n	s
SRNO	43	BRANCA	s	s	s	n	s
TCCML	29	BRANCA	s	s	s	n	s
TDP	22	BRANCA	s	s	s	s	s
VMDS	29	BRANCA	s	s	s	n	n

ANEXO 5.

DADOS CLÍNICOS DE 20 PACIENTES SEM ENDOMETRIOSE.

INICIAIS	IDADE	RAÇA	DISME- NORREIA	DOR PÉLVICA CRÔNICA	DISPAREUNIA DE PROFUNDIDADE	ALTERAÇÕES URINÁRIAS CÍCLICAS	ALTERAÇÕES INTESTINAIS CÍCLICAS
ALF	29	BRANCA	n	n	n	n	n
AMA	34	NEGRA	n	n	n	n	n
APS	29	BRANCA	n	n	n	n	n
DBS	35	BRANCA	n	n	n	n	n
ECPN	33	BRANCA	s	n	n	n	n
EOGN	34	BRANCA	n	n	n	n	n
ES	33	BRANCA	n	n	n	n	n
FTO	28	BRANCA	n	n	n	n	n
IS	26	NEGRA	n	n	n	n	n
LSSL	27	BRANCA	n	n	s	n	n
MAM	38	NEGRA	n	n	n	n	n
MDSM	27	BRANCA	n	n	n	n	n
MFFS	33	NEGRA	n	n	n	n	n
MIS	35	BRANCA	n	n	n	n	n
MJS	35	BRANCA	s	n	s	n	s
MLA	40	BRANCA	n	n	n	n	n
MSA	37	BRANCA	n	n	n	n	n
RABB	30	BRANCA	s	n	n	n	n
RJSL	35	BRANCA	n	n	n	n	n
STAN	40	BRANCA	n	n	n	n	n

ANEXO 6.

CARACTERÍSTICAS DAS LESÕES EM 60 PACIENTES COM ENDOMETRIOSE DO RETO-SIGMOIDE.

INICIAIS	ESTADIA- MENTO	NÚMERO DE LESÕES	TAMANHO DAS LESÕES	CAMADA INTESTINAL ACOMETIDA	TIPO HISTOLÓGICO
AAG	4	2	15 e 20	MUSCULAR INTERNA	S / INDIFERENCIAÇÃO
ACDSG	4	1	35	SUBMUCOSA	INDIFERENCIADO
ACH	4	1	16	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
ADST	4	1	15	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
APDC	4	1	22	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
APNDLP	4	1	30	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
CDF	4	1	8	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
CFRE	4	1	35	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
CGIM	4	1	28	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
CMMC	4	2	25 e 20	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
CMSM	4	1	30	SUBMUCOSA	INDIFERENCIADO
CSFL	4	1	25	MUCOSA	INDIFERENCIADO
ECR	4	2	20 e 22	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
EMM	4	2	43 e 32	SUBMUCOSA	INDIFERENCIADO
FSDNEN	3	1	17	SUBMUCOSA	INDIFERENCIADO
FGAF	4	1	29	SUBMUCOSA	INDIFERENCIADO
FNA	3	1	15	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
FOSDO	4	1	25	SUBMUCOSA	INDIFERENCIADO
FRB	4	1	18	SUBMUCOSA	INDIFERENCIADO
FSMC	3	1	35	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
GASR	4	4	10 14 16 e 28	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
GNB	4	1	65	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
GRB	4	1	9	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
ICB	4	2	40	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
IGPF	4	1	20	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
JABB	4	1	15	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
JYHN	3	1	32	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
KRM	4	1	20	MUCOSA	INDIFERENCIADO
LFML	4	1	18	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
LGODSS	4	1	15	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
LSBDM	4	1	45	SUBMUCOSA	INDIFERENCIADO
MAFR	4	3	40	SUBMUCOSA	INDIFERENCIADO
MAMC	4	1	60	SUBMUCOSA	INDIFERENCIADO
MARP	4	1	25	SUBMUCOSA	INDIFERENCIADO
MBL	4	3	20 22 e 27	SUBMUCOSA	INDIFERENCIADO
MCAF	4	1	32	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
MCDPLM	3	1	19	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
MDLAS	4	1	34	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO

INICIAIS	ESTADIA- MENTO	NÚMERO DE LESÕES	TAMANHO DAS LESÕES	CAMADA INTESTINAL ACOMETIDA	TIPO HISTOLÓGICO
MFM	4	1	35	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
MGRM	4	1	20	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
MHFG	4	1	34	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
MIAS	4	1	32	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
MN	4	1	30	MUSCULAR	INDIFERENCIADO
MZLB	4	2	20 e 25	SUBMUCOSA	INDIFERENCIADO
NOKF	4	2	10 e 15	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
NSDN	4	1	35	SUBMUCOSA	S / INDIFERENCIAÇÃO
PRR	4	1	34	MUSCULAR INTERNA	S / INDIFERENCIAÇÃO
RASMM	3	2	35 e 25	SUBMUCOSA	INDIFERENCIADO
RCSPS	4	1	12	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
RMF	3	1	27	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
RDSS	4	1	28	SUBMUCOSA	S / INDIFERENCIAÇÃO
SAAS	4	1	25	MUCOSA	INDIFERENCIADO
SAP	4	1	19	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
SDMNB	4	2	60 e 30	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
SFHT	4	1	30	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
SHBS	4	1	29	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
SRNO	3	1	55	SUBMUCOSA	INDIFERENCIADO
TCCML	4	1	60	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
TDP	4	1	20	MUSCULAR INTERNA	INDIFERENCIADO
VMDS	4	1	15	MUSCULAR EXTERNA	INDIFERENCIADO

ANEXO 7

ACHADOS IMUNO-HISTOLÓGICOS EM 60 PACIENTES COM ENDOMETRIOSE DO RETO-SIGMOIDE.

INICIAIS	Pesquisa para p53	Pesquisa para c-erB2	Índice de Proliferação (Topoisomerase II-alfa em mil células contadas)		Índice de Apoptose (em 500 células contadas)		Índice de Renovação	
			ESTROMA	GLÂNDULA	ESTROMA	GLÂNDULA	ESTROMA	GLÂNDULA
AAG	Negativo	Negativo	1	1	0	2	NA	0,5
ACDSG	Negativo	Negativo	2	0	2	0	1,0	NA
ACH	Negativo	Negativo	1	2	0	1	NA	2,0
ADST	Negativo	Negativo	1	0	3	0	0,33	NA
APDC	Negativo	Negativo	2	1	0	0	NA	NA
APNDLP	Negativo	Negativo	1	1	3	1	0,33	1,0
CDF	Negativo	Negativo	0	0	1	1	0	0
CFRE	Negativo	Negativo	0	1	0	0	NA	NA
CGIM	Negativo	Negativo	1	0	0	0	NA	NA
CMMC	Negativo	Negativo	1	2	0	1	NA	2,0
CMSM	Negativo	Negativo	0	2	2	1	0	2,0
CSFL	Negativo	Negativo	1	0	2	1	0,5	0
ECR	Negativo	Negativo	1	0	2	0	0,5	NA
EMM	Negativo	Negativo	1	2	0	0	NA	NA
FDSDNEN	Negativo	Negativo	2	2	1	0	2,0	NA
FGAF	Negativo	Negativo	2	4	0	0	NA	NA
FNA	Negativo	Negativo	2	0	2	0	1,0	NA
FOSDO	Negativo	Negativo	0	2	0	0	NA	NA
FRB	Negativo	Negativo	2	1	3	2	0,67	0,5
FSMC	Negativo	Negativo	2	0	0	2	NA	0
GASR	Negativo	Negativo	2	6	0	1	NA	6,0
GNB	Negativo	Negativo	3	2	1	1	3,0	2,0
GRB	Negativo	Negativo	1	1	0	0	NA	NA
ICB	Negativo	Negativo	2	1	3	1	0,67	1,0
IGPF	Negativo	Negativo	1	0	2	1	0,5	0
JABB	Negativo	Negativo	0	2	1	1	0	2,0
JYHN	Negativo	Negativo	3	3	1	0	3,0	NA
KRM	Negativo	Negativo	2	1	0	2	NA	0,5
LFML	Negativo	Negativo	2	2	0	1	NA	2,0
LGODSS	Negativo	Negativo	0	1	5	0	0	NA
LSBDM	Negativo	Negativo	1	3	0	3	NA	1,0
MAFR	Negativo	Negativo	0	1	1	2	0	0,5
MAMC	Negativo	Negativo	1	0	0	0	NA	NA
MARP	Negativo	Negativo	2	1	0	2	NA	0,5
MBL	Negativo	Negativo	3	2	2	2	1,5	1,0
MCAF	Negativo	Negativo	1	0	0	0	NA	NA
MCDPLM	Negativo	Negativo	1	1	0	2	NA	0,5
MDLAS	Negativo	Negativo	1	1	1	0	1,0	NA
MFM	Negativo	Negativo	1	0	0	2	NA	0
MGRM	Negativo	Negativo	1	2	1	0	1,0	NA
MHFG	Negativo	Negativo	0	1	0	0	NA	NA
MIAS	Negativo	Negativo	1	1	0	2	NA	0,5
MN	Negativo	Negativo	0	1	1	0	0	NA
MZLB	Negativo	Negativo	2	2	1	0	1,0	NA

INICIAIS	Pesquisa para p53	Pesquisa para c-erB2	Índice de Proliferação (Topoisomerase II-alfa em mil células contadas)		Índice de Apoptose (em 500 células contadas)		Índice de Renovação	
			ESTROMA	GLÂNDULA	ESTROMA	GLÂNDULA	ESTROMA	GLÂNDULA
NOKF	Negativo	Negativo	0	1	0	3	NA	0,33
NSDN	Negativo	Negativo	1	3	0	0	NA	NA
PRR	Negativo	Negativo	2	0	0	1	NA	0
RASMM	Negativo	Negativo	1	1	1	0	1,0	NA
RCSPS	Negativo	Negativo	0	0	0	2	NA	0
RDSS	Negativo	Negativo	1	0	2	1	0,5	0
RMF	Negativo	Negativo	1	3	0	3	NA	1,0
SAAS	Negativo	Negativo	1	1	1	0	1,0	NA
SAP	Negativo	Negativo	0	1	1	0	0	NA
SDMNB	Negativo	Negativo	0	0	0	1	NA	0
SFHT	Negativo	Negativo	2	1	0	2	NA	0,5
SHBS	Negativo	Negativo	3	2	1	2	3,0	1,0
SRNO	Negativo	Negativo	2	0	1	2	1,0	0
TCCML	Negativo	Negativo	1	2	0	1	NA	2,0
TDP	Negativo	Negativo	0	0	2	0	0	NA
VMDS	Negativo	Negativo	1	2	1	0	1,0	NA

ANEXO 8

ACHADOS IMUNO-HISTOLÓGICOS EM 20 PACIENTES SEM ENDOMETRIOSE.

INICIAIS	Pesquisa para p53	Pesquisa para c-erB2	Índice de Proliferação (Topoisomerase II-alfa em mil células contadas)		Índice de Apoptose (em 500 células contadas)		Índice de Renovação	
			ESTROMA	GLÂNDULA	ESTROMA	GLÂNDULA	ESTROMA	GLÂNDULA
ALF	Negativo	Negativo	3	8	1	2	3	4
AMA	Negativo	Negativo	3	3	0	1	NA	3
APS	Negativo	Negativo	4	3	3	4	1,33	0,75
DBS	Negativo	Negativo	3	2	3	0	1	NA
ECPN	Negativo	Negativo	3	3	0	0	NA	NA
EOGN	Negativo	Negativo	8	4	1	0	8	NA
ES	Negativo	Negativo	3	4	0	0	NA	NA
FTO	Negativo	Negativo	3	2	2	3	1,5	0,67
IS	Negativo	Negativo	1	4	0	0	NA	NA
LSSL	Negativo	Negativo	2	5	1	1	2	5
MAM	Negativo	Negativo	5	3	1	2	5	1,5
MDSM	Negativo	Negativo	1	2	0	0	NA	NA
MFFS	Negativo	Negativo	3	1	4	0	0,75	NA
MIS	Negativo	Negativo	2	3	0	1	NA	3
MJS	Negativo	Negativo	2	2	0	0	NA	NA
MLA	Negativo	Negativo	3	2	2	8	1,5	0,25
MSA	Negativo	Negativo	4	3	2	1	2	3
RABB	Negativo	Negativo	2	2	1	3	2	0,67
RJSL	Negativo	Negativo	1	2	1	1	1	2
STAN	Negativo	Negativo	1	5	0	0	NA	NA

8. REFERÊNCIAS*

Abrão MS, Carvalho FM, Marques JA, Melo P, Schupp T, Noronha S. Histologic classification of endometriosis: Its importance to the therapeutic response. In: World Congress of Endometriosis 4. Salvador, 1994. [Proceedings, p. 19].

Abrão MS, Dias JA Jr., Podgaec S. Histórico e aspectos epidemiológicos da endometriose: Uma doença prevalente e de conhecimento antigo. In: Abrão MS. Endometriose: Uma visão contemporânea. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p. 1-11.

Abrão MS, Gonçalves MO, Ajossa S, Melis GB, Guerriero S. The sonographic diagnosis of deep endometriosis. J Ultrasound Med 2009; 28(3):408-9.

Abrão MS, Neme RM, Averbach M, Petta CA, Aldrighi JM. Rectal ultrasound with a radial probe in the assessment of rectovaginal endometriosis. J Am Gynecol Lapar 2004; 11:50-4.

Abrão MS, Neme RM, Averbach M. Endometriose de septo retovaginal: Doença de diagnóstico e tratamento específico. Arq Gastroenterol 2003a; 40:192-7.

Abrão MS, Neme RM, Carvalho FM, Aldrighi JM, Pinotti JA. Histological classification of endometriosis as a predictor of response treatment. Gynecol Obstet 2003b; 82:31-40.

Abrão MS, Podgaec S, Pinotti JA, Oliveira RM. Tumor markers in endometriosis. Int J Gynaecol Obstet 1999; 66(10):19-22.

Adimoolam S, Ford JM. p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. DNA Repair (Amst.) 2003; 2(9):947-54.

Agic A, Djalai S, Diedrich K, Hornung D. Apoptosis in endometriosis. Gynecol Obstet Invest 2009; 68:217-23.

Aguiar FM. Proliferação e apoptose em endométrio típico e ectópico de pacientes com endometriose peritoneal, ovariana e de septo retovaginal [dissertação]. Ribeirão Preto, SP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto; 2007. 67p.

Allan DJ, Howell A, Roberts SA et al. Reduction in apoptosis relative to mitosis in histologically normal epithelium accompanies fibrocystic change and carcinoma of the premenopausal human breast. J Pathol 1992; 167:25-32.

Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD. *In situ* end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. J Pathol 1993; 170:1-8.

* Adaptado de *International Committee Medical Journals Editors* (Vancouver), de acordo com Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Bibliotecas e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Annaliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Sueli C. Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Antunes A, Silva T, Godinho I, Amaral N, Oliveira C. Valor prognóstico da expressão por imuno-histoquímica do c-Erb-2 em doentes sob terapêutica adjuvante com tamoxifeno por carcinoma primário da mama. *Acta Med. Port.* 2004; 17:271-6.

ASRM - American Society for Reproductive Medicine. Revised American Fertility Society Classification of Endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997; 67:817-21.

Assenza M, Romagnoli F, Simonelli L, Ricci G, Bertolucci P, Modini C. Acute appendicitis or something else? A case report of cecal endometriosis in emergency setting. *Ann Ital Chir* 2004; 75:583-6.

Averbach M, Abrão MS, Podgaec S, Correa P. Rectal endometriosis. *Gastroenterol Endoscop* 2005; 62(6):978-9.

Baselga J, Albanell J. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Ann Oncol* 2001; 12(Suppl 1):S35-41.

Bassi MA, Podgaec S, Dias Júnior JA, Sobrado CW, D'Amico Filho N, Abrão MS. Bowel endometriosis: a benign disease? *Rev Assoc Med Bras* 2009; 55(5):611-6.

Benoit V, de Moraes E, Dar NA, Taranchon E, Bours V, Hautefeuille A et al. Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 by tumor suppressor p53 requires nuclear factor-kappaB. *Oncogene* 2006; 25(42):5708-18.

Bergqvist A, Ferno M, Mattson S. A comparison of cathepsin D levels in endometriotic tissue and in uterine endometrium. *Fertil Steril* 1996; 65:1130-4.

Bianchi A, Pulido L, Espin F, Hidalgo LA, Heredia A, Fantova MJ et al. Endometriosis. *Cir Esp* 2007; 81:170-6.

Bischoff FZ, Heard M, Simpson JL. Somatic DNA alterations in endometriosis: high frequency of chromosome 17 and p53 loss in late-stage endometriosis. *J Reprod Immunol* 2002; 55(1-2):49-64.

Braun DP, Ding J, Shaheen F, Willey JC, Rana N, Dmowski WP. Quantitative expression of apoptosis-regulating genes in endometrium from women with and without endometriosis. *Fertil Steril* 2007; 87(2):263-8.

Brinton LA, Gridley G, Persson I, Baron J, Bergqvist A. Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176(3):572-9.

Bruson GL, Barclay DL, Sanders M, Araoz CA. Malignant extraovarian endometriosis: Two cases report and review of the literature. *Gynecol Oncol* 1988; 30:123-30.

Brustmann H. Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase (hTERT), topoisomerase IIalpha expression, and apoptosis in endometrial adenocarcinoma and atypical hyperplasia. *Int J Gynecol Pathol* 2005; 24(2):184-92.

Carvalho FM, Abrão MS. Histopatologia da endometriose: A importância da interação entre ginecologista e patologista. In: Abrão MS. *Endometriose: Uma visão contemporânea*. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p. 35-44.

Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function and mechanism. *Annu Rev Biochem* 2001; 70:369-413.

Chapron C, Chopin N, Borghese B, Foulot H, Dousset B, Vacher-Lavenu MC et al. Deeply infiltrating endometriosis: pathogenetic implications of the anatomical distribution. *Hum Reprod* 2006; 21(7):1839-45.

Chapron C, Pietan-Vialle C, Borghese B, Davy C, Foulot H, Chopin N. Associated ovarian endometrioma is a marker for greater severity of deeply infiltrating endometriosis. *Fertil Steril* 2009; 92(2):453-7.

Chen CC, Gau JP, You JY, Lee KD, Yu YB et al. Prognostic significance of beta-catenin and topoisomerase II alpha in de novo acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 2009; 84(2):87-92.

Cho HY, Kim MK, Cho SJ, Bae JW, Kim I. Endometrial stromal sarcoma of the sigmoid colon arising in endometriosis: A case report and review of the literature. *J. Korean Med Sci* 2002; 17:412-4.

Cochran W. Sampling techniques. 3. ed. New York: John Wiley & Sons; 1986. p. 75.

Cornillie F, Oosterlynk D, Lauwerins J. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: Histology and clinical significance. *Fertil Steril* 1990; 53:978-83.

Coronado Martín PJ, Fasero Laiz M, García Santos J, Ramírez Mena M, Vidart Aragón JA. Overexpression and prognostic value of p53 and HER2/neu proteins in benign ovarian tissue and in ovarian cancer. *Med Clin (Barc.)* 2007; 128(1):1-6.

Coss A, Tosetto M, Fox EJ, Sapetto-Rebow B, Gorman S, Kennedy BN et al. Increased topoisomerase II alpha expression in colorectal cancer is associated with advanced disease and chemotherapeutic resistance via inhibition of apoptosis. *Cancer Lett* 2009; 276(2):228-38.

Darai E, Thomassin I, Barranger E, Detchev R, Cortez A, Houry S et al. Feasibility and clinical outcome of laparoscopic colorectal resection for endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192:392-400.

Deweese JE, Osheroff MA, Osheroff N. DNA topology and topoisomerases: Teaching a knotty subject. *Biochem Mol Biol Educ* 2008; 37(1):2-10.

Dmowski WP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Braun DP. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. *Hum Reprod* 2001; 16(9):1802-8.

Douglas C, Rotimi O. Extragenital endometriosis: A clinicopathological review of a Glasgow hospital experience. *J Obstet Gynaecol* 2004; 24:804-8.

Dufournet C, Uzan C, Fauvet R, Cortez A, Siffroi JP, Darai E. Expression of apoptosis-related proteins in peritoneal, ovarian and colorectal endometriosis. *J Reprod Immunol* 2001; 70(1-2):151-62.

Erzen M, Kovacic J. Relationship between endometriosis and ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 1998; 19:553-5.

Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997; 24:235-58.

Faggad A, Darb-Esfahani S, Wirtz R, Sinn B, Sehouli J, Könsgen D et al. Topoisomerase II alpha mRNA and protein expression in ovarian carcinoma: correlation with clinicopathological factors and prognosis. *Mod Pathol* 2009; 22(4):579-88.

Falco M, Ragusa M, Oliva G, Miranda A, Parmeggiani D, Sperlongano P, et al. Endometriosis esterna: Patologia di esclusivo interesse ginecologico? Il punto di vista del chirurgo generale. *G Chir* 2007; 28:83-92.

Farquhar CM. Extracts from the clinical evidence. Endometriosis. BMJ 2000; 320:1449-52.

Ferrero S, Hass S, Remorgida V, Camerini G, Fulcheri E, Ragni N et al. Loss of sympathetic nerve fibers in intestinal endometriosis. Fertil Steril 2010; 94(7):2817-9.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson AS. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 1992; 119:493-501.

Gebel AJH, Braun DP, Tambur A, Frame D, Rana N, Dmowski DP. Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. Fertil Steril 1998; 9:1042-7.

Gogusev J, Bouquet de Jolinière J, Telvi L, Doussau M, du Manoir S, Stojkoski A, Levardon M. Genetic abnormalities detected by comparative genomic hybridization in a human endometriosis-derived cell line. Mol Hum Reprod 2000; 6(9):821-7.

Gompel A, Sabourin JC, Martin A. Bcl-2 expression in normal endometrium during the menstrual cycle. Am J Pathol 1994; 144:1195-1202.

Gonçalves MO, Dias JA Jr, Podgaec S, Averbach M, Abrão MS. Transvaginal ultrasound after bowel preparation to assist surgical planning for bowel endometriosis resection. Int J Gynaecol Obstet 2009; 104(2):161.

González-Ramos R, Van Langendonck A, Defrère S, Lousse JC, Mettlen M, Guillet A et al. Agents blocking the nuclear factor-kappaB pathway are effective inhibitors of endometriosis in a *in vivo* experimental model. Gynecol Obstet Invest 2008; 65(3):174-86.

Gorczyca W, Markiewski M, Kram SL. Immunohistochemical analysis of bcl-2 and p53 expression in breast carcinomas: Their correlation with Ki-67 growth fraction. Virchows Arch 1995; 426:229-33.

Goumenou AG, Arvanitis DA, Matalliotakis IM, Koumantakis EE, Spandidos DA. Loss of heterozygosity in adenomyosis on hMSH2, hMLH1, p16Ink4 and GALT loci. Int J Mol Med 2000; 6(6):667-71.

Greenhill JP. The yearbook of obstetrics and gynecology. New York: The Yearbook Publisher; 1942. p. 431.

Halban J. Histeroadenosis metastatica. Die lymphogene Genese der Adenofibromatosis heterotopica. Arch Gynäk 1925; 124:457-82.

Harada T, Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Makrydimas G, Sofikitis N et al. Apoptosis in human endometrium and endometriosis. Hum Reprod Update 2004; 10(1):29-38.

Hassa H, Tanir HM, Tekin B, Artan S, Dundar E, Kirilmaz SD et al. Apoptosis patterns in eutopic and ectopic endometrium, adhesions and normal-looking peritoneum from women with or without endometriosis. Arch Gynecol Obstet 2009; 280(2):195-9.

Hellemans P, van Dam PA, Geyskens M, von Oosterom AT, Buytaert P, van Marck E. Immunohistochemical study of topoisomerase II-alpha in primary ductal carcinoma of the breast. J Clin Pathol 1995; 48:147-50.

- Hitti IF, Glasberg SS, Lubicz S. Clear cell carcinoma arising in extraovarian endometriosis: Report of three cases and review of the literature. *Gynecol Oncol* 1990; 39:314-20.
- Hoang CD, Boettcher AK, Jessurun J, Pambuccian SE, Bullard KM. An unusual rectosigmoid mass: Endometrioid adenocarcinoma arising in colonic endometriosis: Case report and literature review. *Am Surg* 2005; 71:694-7.
- Holubec H, Payne CM, Bernstein H, Dvorakova K, Bernstein C, Waltmire CN et al. Assessment of apoptosis by immunohistochemical markers compared to cellular morphology in ex-vivo stressed colonic mucosa. *J Histochem Cytochem* 2005; 53(2):229-35.
- Ilad RS, Fleming SD, Bebington CR, Murphy CR. Ubiquitin is associated with the survival of ectopic stromal cells in endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2:69.
- Isola J, Tanner M, Holli K. Amplification of topoisomerase II alpha is a strong predictor of response to epirubicin-based chemotherapy in HER2/neu positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 64:S15.
- Javert CT. Pathogenesis of endometriosis based on homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, lymphatic and hematogenous metastasis. *Cancer* 1949; 2:399-404.
- Jiang X, Hitchcock A, Bryan EJ, Watson RH, Englefield P, Thomas EJ et al. Microsatellite analysis of endometriosis reveals loss of heterozygosity at candidate ovarian tumor suppressor gene loci. *Cancer Res* 1996; 56:3534-9.
- Jimbo H, Hitomi Y, Yoshikawa H, Yano T, Momoeda M, Sakamoto A et al. Evidence for monoclonal expansion of epithelial cells in ovarian endometrial cysts. *Am J Pathol* 1997; 150:1173-8.
- Jones KD, Owen E, Berresford A, Sutton C. Endometrial adenocarcinoma arising from endometriosis of the rectosigmoid colon. *Gynecol Oncol* 2002; 86:220-2.
- Jones RK, Searle RF, Bulmer JN. Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 1998; 13:2496-502.
- Johnson MC, Torres M, Alves A, Bacallao K, Fuentes A, Vega M et al. Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:45.
- Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73:2013-26.
- Kim JS, Hur H, Min BS, Kim H, Sohn SK, Cho CH et al. Intestinal endometrioses mimicking carcinoma of rectum and sigmoid colon: a report of five cases. *Yonsei Med J* 2009; 50(5):732-5.
- Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Ann Rev Physiol* 1991; 53:217-39.
- Koh EA, Ilingworth PJ, Duncan WC. Immunolocalization of bcl-2 protein in human endometrium in the menstrual cycle and simulated early pregnancy. *Hum Reprod* 1995; 10:1557-62.

Kosugi Y, Elias S, Malinak LR, Nagata J, Isaka K, Takayama M, Simpson JL, Bischoff FZ. Increased heterogeneity of chromosome 17 aneuploidy in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180(4):792-7.

La Grenade A, Silverberg SG. Ovarian tumors associated with atypical endometrioses. *Hum Pathol* 1988; 19:1080-4.

Laufer MR, Goldstein DP. Dysmenorrhea, pelvic pain and the premenstrual syndrome. In: Emans SJ, Laufer MR, Goldstein DP (ed.). *Pediatric and adolescent gynecology*. New York: Lippincott; 1998. p. 363-410.

Leng J, Lang J, Guo L, Li H, Liu Z. Carcinosarcoma arising from atypical endometriosis in a cesarean scar. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16:432-5.

Li T-K, Liu LF. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:53-77.

Marchevsky AM, Kaneko M. Bilateral ovarian endometriosis associated with carcinosarcoma of the right ovary and endometrial carcinoma of the left ovary. *Am j Clin Pathol* 1978; 70:709-12.

Mascaretti G, Di Berardino C, Mastrocola N, Patacchiola F. Endometriosis: Rare localizations in two cases. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2007; 34:123-5.

McClendon AK, Osheroff N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutat Res* 2007; 623(1-2):83-97.

McDonnell TJ. Cell division versus cell death: A functional model of multistep neoplasia. *Mol Carcinog* 1993; 8:209-13.

McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS. Immunolocalization of apoptosis regulating proteins Bcl-2 and Bax in human endometrium and isolated peritoneal fluid macrophages. *Hum Reprod* 1997; 12:146-52.

Meigs JV. Endometriosis: Etiologic role of marriage, age and parity: conservative treatment. *Obstet Gynecol* 1953; 2:46-50.

Melin A, Sparén P, Persson I, Bergqvist A. Endometriosis and the risk of cancer with special emphasis on ovarian cancer. *Hum Reprod* 2006; 21(5):1237-42.

Metzger DA, Haney AF. Etiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1989; 16:1-14.

Meyer R. Über den Staude der Adenomyosites Adenomyoma in Allgemeinen und Adenomyonitis Sarcomatosa. *Zentralbl Gynakol* 1919; 36:745-59.

Mirski SEL, Sparks KE, Yu Q, Lang AJ, Jain N, Campling BG, Cole SPC. A truncated cytoplasmic topoisomerase II alpha in a drug resistant lung cancer cell line is encoded by a *TOP2* allele with a partial deletion of exon 34. *Int J Cancer* 2000; 85:534-9.

Mommers ECM, van Diest PJ, Leonhart AM, Meijier CJ, Baak JP. Balance of cell proliferation and apoptosis in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 58:163-9.

Mondal, N.; Parvin, J. DNA topoisomerase II-alpha is required for RNA polymerase II transcription on chromatin templates. *Nature* 2001; 413:435-8.

Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995; 374:131-4.

Morgan JG, Dolganov GM, Robbins SE. The selective isolation of novel cDNAs encoded by the regions surrounding the human interleukin 4 and 5 genes. *Nucleic Acids* 1992; 20:5173-9.

Mourra N, Tiret E, Parc Y, De Saint-Maur P, Parc R, Flejou JF. Endometrial stromal sarcoma of the rectosigmoid arising in extragonadal endometriosis and revealed by portal vein thrombosis. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125:1088-90.

Nakamura H, Inokuchi K, Yamaguchi H, Dan K. Abnormalities of p51, p53, FLT3 and N-ras genes and their prognostic value in relapsed leukemia. *J Nippon Med Sch* 2004; 71(4):270-8.

Nakayama K, Toshihiko T, Zhai Y-L, Lu X, Horiuchi A, Nikaido T et al. Demonstration of focal p53 expression without genetic alterations in endometriotic lesions. *Int J Gynecol Pathol* 2001; 20(3):227-31.

Nasu K, Hayata T, Takai N, Kawano Y, Sugano T, Matsui N, Miyakawa I. Immunohistochemical study of c-erb B2 protein expression in endometriosis. *Hum Reprod* 1995; 10(4):935-7.

Nezhat F, Cohen C, Rehamen J, Gretz H, Cole P, Kalir T. Comparative immunohistochemical studies of bcl-2 and p53 proteins in benign and malignant ovarian endometriotic cysts. *Cancer* 2002; 1(94):2935-40.

Nielsen KV, Müller S, Møller S, Schonau A, Balslev E, Knoop AS et al. Aberrations of ERBB2 and TOP2AA genes in breast cancer. *Mol Oncol* 2010; 4(2):161-8.

Nilbert M, Pejovic T, Mandahl N, Iosif S, Willen H, Mitelman F. Monoclonal origin of endometriotic cysts. *Int J Gynecol Cancer* 1995; 5:61-3.

Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997; 68:585-96.

Oakman C, Moretti E, Galardi F, Santarpia L, Di Leo A. The role of topoisomerase II alpha and HER-2 in predicting sensitivity to anthracyclines in breast cancer patients. *Cancer Treat Rev* 2009; 35(8):662-7.

Obata K, Hoshiai H. Common genetic changes between endometriosis and ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 50(Suppl. 1):39-43.

Otsuki Y, Misaki O, Sugimoto O. Cyclic bcl-2 gene expression in human uterine endometrium during menstrual cycle. *Lancet* 1994; 344:28-29.

Parton M, Dowsett M, Smith I. Studies of apoptosis in breast cancer. *Br Med J* 2001; 322:1528-32.

Paul S, Bhattacharya P, Mahapatra PD, Swarnakar S. Melatonin protects against endometriosis via regulation of matrix metalloproteinase-3 and an apoptotic pathway. *J Pineal Res* 2010; 49(2):156-68.

Pelch KE, Schroder AL, Kimball PA, Sharpe-Timms KL, Davis JW, Nagel SC. *Fertil Steril* 2010; 93(5):1615-27.

Pilka R, Micková I, Lubuský M, Dusková M, Ríčánková M, Kudela M. Expression of p53, Ki-67, bcl-2, c-erb-2, estrogen, and progesterone receptors in endometrial cancer. *Ceska Gynekol* 2008; 73(4):222-7.

Podgaec S, Abrão MS, Dias JA, Rizzo LV, Oliveira RM, Bacarat EC. Endometriosis: an inflammatory disease with Th2 immune response component. *Hum Reprod* 2007; 22(5):1373-9.

Prefumo F, Venturini PL, Fulcheri E. Analysis of p53 and c-erb-B2 expression in ovarian endometroid carcinomas arising in endometriosis. *Int J Gynecol Pathol* 2003; 22(1):83-8.

Pritchard KI, Messersmith H, Elavathil L, Trudeau M, O'Malley F, Dhesy-Thind B. HER-2 and topoisomerase II as predictors of response to chemotherapy. *J Clin Oncol* 2008; 26(5):736-44.

Prowse AH, Manek S, Varma R, Liu J, Godwin AK, Maher ER, Tomlinson IP, Kennedy SH. Molecular genetic evidence that endometriosis is a precursor of ovarian cancer. *Int J Cancer* 2006; 119(3):556-62.

Pupa SM, Tagliabue E, Ménard S, Anichini A. HER-2: a biomarker at the crossroads of breast cancer immunotherapy and molecular medicine. *J Cell Physiol* 2005; 205(1):10-8.

Pupo-Nogueira A, Oliveira RM, Petta CA, Podgaec S, Abrão MS. Vascular endothelial growth factor concentrations in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 2007; 99(1):33-7.

Rafailidis S, Symeonidis N, Ballas K, Psarras K, Pavlidis T, Patsiaoura K, Sakadamis A. Deeply infiltrating rectal endometriosis with lymph node involvement. *Acta Chir Belg* 2010; 110(2):210-2.

Reed SI, Bailly E, Dulic V, Hengst L, Resnitzky D, Slingerland J. G1 control in mammalian cells. *J Cell Sci Suppl* 1994; 18:69-73.

Ribeiro HS, Ribeiro PA, Rossini L, Rodrigues FC, Donadio N, Aoki T. Doublé-contrast barium enema and transrectal endoscopic ultrasonography in the diagnosis of intestinal deeply infiltrating endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol* 2008; 15(3):315-20.

Rosa e Silva JC, Garcia SB, Rosa e Silva AC, Candido dos Reis FJ, Poli Neto OB, Ferriani RA et al. Increased cell proliferation in experimentally induced endometriosis in rabbits. *Fertil Steril* 2010; 93(5):1637-42.

Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Hortobagyi GN. HER-2/neu testing in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 2003; 120(Suppl.):S53-71.

Sáinz de la Cuesta R, Izquierdo M, Cañamero M, Granizo JJ, Manzarbeitia F. Increased prevalence of p53 overexpression from typical endometriosis to atypical endometriosis and ovarian cancer associated with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 113(1):87-93.

Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14:422-69.

Schneider J, Jimenez E, Rodriguez F, del Tanago JG. c-myc, c-erb-B2, nm23 and p53 expression in human endometriosis. *Oncol Rep* 1998; 5(1):49-52.

Sengupta S, Harris CC. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(1):44-55. Review.

Sharpe-Timms KL, Penney LL, Zimmer RL, Wright JA, Zhang Y, Surewicz K. Partial purification and amino acid sequence analysis of endometriosis protein II (ENDO-II) reveals homology with tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1). *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:3784-7.

Sheen-Che SM, Huang CY, Zhang H, Huang CC, Tang RP. Lack of prognostic value of topoisomerase II alpha in patients with breast cancer: analysis with tissue microarray. *Anticancer Res* 2010; 30(6):2459-62.

Sherr CJ. G1 phase progression: Cycling on cue. *Cell* 1994; 79:551-4.

Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995; 9:1149-63.

Shin JC, Ross HL, Elias S, Nguyen DD, Mitchell-Leef D, Simpson JL, Bischoff FZ. Detection of chromosomal aneuploidy in endometriosis by multi-color fluorescence in situ hybridization (FISH). *Hum Genet* 1997; 100(3-4):401-6.

Singh P, Bhardwaj A. Mechanism of action of key enzymes associated with cancer propagation and their inhibition by various chemotherapeutic agents. *Mini Rev Med Chem* 2008; 8(4):388-98.

Siristatidis C, Nissotakis C, Chrelias C, Iacovidou H, Salamalekis E. Immunological factors and their role in the genesis and development of endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res* 2006; 32(2):162-70.

Sjöström J, Bergh J. How apoptosis is regulated, and what goes wrong in cancer. *Br Med J* 2001; 322:1538-9.

Slavin RE, Krum R, Van Dinh T. Endometriosis-associated intestinal tumors: a clinical and pathological study of 6 cases with a review of the literature. *Hum Pathol* 2000; 31(4):456-63. Review.

Sokalska A, Wong DH, Cress A, Piotrowski PC, Rzepczunska I, Villanueva J et al. Simvastatin induces apoptosis and alters cytoskeleton in endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(7):3453-9.

Solomon MJ. Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5:180-6.

Soong R, Robbins PD, Dix BR, Grier F, Lim B, Knowles S. et al. Concordance between p53 protein overexpression and gene mutation in a large series of common human carcinomas. *Hum Pathol* 1996; 27:1050-5.

Stern RC, Dash R, Bentley RC, Snyder MF, Haney AF, Robboy SJ. Malignancy in endometriosis: Frequency and comparisons of ovarian and extraovarian types. *Int J Gynecol Pathol* 2001; 20:133-9.

Swiersz LM. Role of endometriosis in cancer and tumor development. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955:281-92.

Thomas EJ, Campbell IG. Evidence that endometriosis behaves in a malignant manner. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 50(suppl1):2-10.

Tomasini R, Mak TW, Melino G. The impact of p53 and p73 on aneuploidy and cancer. *Trend Cell Biol* 2008; 18(5):244-52.

Tsiambas E, Alexopoulou D, Gerontopoulos K, Karakitsos P, Karameris A. Targeting topoisomerase II α in endometrial adenocarcinoma: a combined chromogenic in situ hybridization and immunohistochemistry study based on tissue microarrays. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16(3):1424-31.

Ulrich U, Richter O, Wardelmann E, Valter M, Schmoltzer R, Sillem M et al. Endometriosis and malignoma. *Zentralbl Gynakol* 2003; 125:239-42.

Van Gorp T, Amant F, Neven P, Vergote I, Moerman P. Endometriosis and the development of malignant tumours of the pelvis. A review of literature. *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol* 2004; 18(2):349-71.

von Rokitsansky BC. *Lehrbuch der pathologischen Anatomie*. 3. ed. [revisada]. Vienna: Wilhelm Braumüller; 1861. Volume 3. p. 423.

Wang G, Tokushige N, Russell P, Dubinovsky S, Markham R, Frase IS. *J Minim Invasive Gynecol* 2009; 16(6):713-9.

Watanabe H, Kanzaki H, Narukwa S, Inoue T, Katsuragawa H, Kaneki Y et al. Bcl-2 and Fas expression in eutopic and ectopic human endometrium during the menstrual cycle in relation to endometrial cell apoptosis. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:360-8.

Weed JC, Arguembourg PC. Endometriosis: Can it produce an autoimmune response resulting in infertility? *Clin Obstet Gynecol* 1980; 23:885-93.

Woessner RD, Mattern MR, Mirabelli CK, Johnson RK, Drake FH. Proliferation and cell cycle-dependent differences in the expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II- α in NIH-3T3 cells. *Cell Growth Differ* 1991; 2:209-14.

Zhang GJ, Kimijima I, Abe R. Correlation between the expression of apoptosis-related bcl-2 and p53 oncoproteins and the carcinogenesis and progression of breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 1997; 3:2329-35.

Zubor P, Hatok J, Galo S, Dokus K, Klobusiakova D, Danko J et al. Anti-apoptotic and pro-apoptotic gene expression evaluated from eutopic endometrium in the proliferative phase of the menstrual cycle among women with endometriosis and healthy controls. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 145(2):172-6.