

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE EM ENDOMÉTRIO
TÓPICO E ECTÓPICO DE PACIENTES COM
ENDOMETRIOSE PERITONEAL, OVARIANA E DE
SEPTO RETO-VAGINAL**

Flávia Maciel de Aguiar

RIBEIRÃO PRETO – SP

2007

Flávia Maciel de Aguiar

**PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE EM ENDOMÉTRIO
TÓPICO E ECTÓPICO DE PACIENTES COM
ENDOMETRIOSE PERITONEAL, OVARIANA E DE
SEPTO RETO-VAGINAL**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Preto para
obtenção do título de Mestre em
Medicina, Área de concentração –
Ginecologia e Obstetrícia

Orientador: Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani

RIBEIRÃO PRETO – SP

2007

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Aguiar, Flávia Maciel de.

Proliferação celular e apoptose em endométrio tópico e ectópico de pacientes com endometriose peritoneal, ovariana e de septo reto-vaginal, Ribeirão Preto, 2007.

72p. : il. ; 29,7cm

Tese de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Tocoginecologia.

Orientador: Ferriani, Rui Alberto

1. Endometriose, 2. Endométrio, 3. Proliferação celular,
4. Apoptose, 5. PCNA, 6. *fas*.

DEDICO ESTE TRABALHO:

“Àquele que é poderoso para fazer tudo muito mais abundantemente além daquilo que pedimos ou pensamos, segundo o poder que em nós opera, à Ele seja a glória....”
(Ef.3:20-21).

Á Beatrice e Nelson, exemplos de integridade e caráter, pai zelosos e amorosos, pilares de uma família unida e feliz. Devo tudo a vocês!!!!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani, pela oportunidade de aprender e trabalhar com pesquisa científica, pelas portas abertas sempre, pelo exemplo de capacidade, integridade, ousadia e espírito de liderança.

Ao Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia, por nos ter aberto o seu laboratório com simpatia, nos ajudando no entendimento das técnicas de imunohistoquímica, além de ter-nos auxiliado com suas preciosas colaborações. A funcionária Rose do laboratório de Patologia, pela ajuda e amizade.

Ao Prof Dr. Maurício Abrão pela presença e inestimável colaboração. É uma honra ter em minha banca uma sumidade em endometriose. Minha admiração sempre!

Às mulheres que gentilmente se propuseram a participar deste estudo. Sem vocês este trabalho não se realizaria.

Ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por ter-me acolhido em 2001 e propiciado meios para o meu desenvolvimento profissional e agora também científico, casa querida e amada, de onde sempre levarei as mais doces lembranças. A todos os docentes e funcionários, meu muito obrigado.

À Comissão de Pós-graduação em Tocoginecologia, pela oportunidade de fazer este mestrado. Sinto-me muito orgulhosa de pertencer a uma casa tão conceituada e primorosa. Um carinho especial para Ilza e Taisa.

Minha especial gratidão ao Dr. Júlio César Rosa Sá e Silva, amigo querido, profissional brilhante, meu tutor em quem me espelho. Seu estímulo constante e sua inestimável ajuda me levaram adiante nos momentos de desânimo. Muito obrigada!!

Aos amigos queridos do departamento de Ginecologia que sempre me ajudaram em tudo. Um especial agradecimento à: Ana Carolina Sá, Carol Sales, Well, Lauriane, Marianinha, Elaine.

Ao meus amigos pessoais que me sustentaram aqui em Ribeirão Preto, se tornando uma família pra mim: Claudinha, Conrado, Flavia Raquel, Renato, Maria Rita, Stefânia, Luciana, Daniela, Nelson Sato, Ed Kauss, Daniela de Curitiba.

As minhas amigas de Vitória, que sempre me apoiaram em tudo: Camilinha, Karol, Fabiana e Renata.

A minha querida dupla de trabalho Alexandre que sempre me ajudou e apoiou em tudo, com quem aprendo a cada dia. Admiro muito você!!!

Aos meus companheiros de trabalho da Clínica Mater Bella (Dra. Patrícia, Dra. Letícia, Dra. Rosângela, Dr. Fernando, Dr. Simão (anestesista)) e às minhas secretárias Marcinha e Carol, sempre prontos a ajudar.

Aos meus irmãos preciosos da Primeira Igreja Batista de Ribeirão Preto e em especial à amiga Renatinha, fonte de conselhos maravilhosos e um pilar de oração pra mim.

À minha vovó Ely, meus irmãos Nelsinho, Fernanda e Thiago, cunhadas Lílian e Karol, cunhado Aloyr e sobrinhas Bia e Malu que, mesmo morando tão longe, torcem e se orgulham de mim. Amo vocês e sinto por vocês não poderem estar aqui neste dia especial.

A todos que, direta ou indiretamente colaboraram com este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Conceito	2
1.2 Patogenia.....	4
1.2.1 Proliferação Celular e Apoptose – a Homeostase Tecidual.....	6
1.2.1.1 - Proliferação Celular	7
1.2.1.2 - Apoptose celular	8
1.2.2 - Como as células endometriais refluídas aderem ao peritônio pélvico.....	15
1.2.3 - Como as células endometriais aderidas invadem a MEC	15
1.2.4 - Como os novos implantes crescem e sobrevivem	16
1.2.5 - O sistema imune	17
1.2.6 - Estresse Oxidativo	21
1.2.7 - Os fatores hormonais na gênese da endometriose	23
1.2.8 - Marcadores séricos e Regulação Gênica na Endometriose	25
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Material	31
3.2 Método Imunohistoquímico.....	32
3.2.1: Marcadores Imunohistoquímicos.....	32
3.2.2: Técnica de Imunohistoquímica	32

3.3 - Critérios de avaliação imunohistoquímica	33
3.4 - Análise estatística	34
4. RESULTADOS	35
4.1 Avaliação do Índice de Proliferação Celular (IPC)	36
4.1.1 – Tecido Glandular.....	36
4.1.2 – Tecido Estromal	36
4.2 Avaliação do Índice Apoptótico (IA)	38
4.2.1 – Tecido Glandular.....	38
4.2.2 - Tecido Estromal.....	39
5. DISCUSSÃO.....	43
Proliferação Celular	44
Apoptose	47
6. CONCLUSÕES.....	50
7. BIBLIOGRAFIA	52
ANEXOS.....	68

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema do processo de ativação da apoptose pela via dos receptores *fas*-*fasL* e pela via mitocondrial..... 11
- Figura 2: Possíveis alterações fisiopatológicas na cavidade peritoneal de mulheres com endometriose. O endométrio anormal da endometriose em ROS (espécies reativas de oxigênio), antioxidantes, metaloproteinases e seus inibidores (MMPs e TIMPs). (adaptado de Wu & Ho, 2003)..... 21
- Figura 3: Mecanismo de estresse oxidativo na endometriose. (adaptado de Langendonck *et al*, 2002..... 23
- Figura 4: Marcação com PCNA em tecido glandular (setas) - aumento de 400 x. 38
- Figura 5: Marcação pelo *fas* em glândula (setas) – aumento de 400 x. 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado do IPC nos diferentes tipos de lesão endometriótica quando comparados com seus respectivos endométrios tópicos – GLÂNDULA..... 37

Tabela 2 - Resultado do IPC nos diferentes tipos de lesão endometriótica quando comparados com seus respectivos endométrios tópicos – ESTROMA..... 37

Tabela 3 – Resultado do IA nos diferentes tipos de lesão endometriótica quando comparados com seus respectivos endométrios tópicos – GLÂNDULA..... 41

Tabela 4 – Resultado do IA nos diferentes tipos de lesão endometriótica quando comparados com seus respectivos endométrios tópicos – ESTROMA..... 41

LISTA DE ABREVIATURAS

CO - dióxido de carbono

DISC - *Death Inducing Signalling Complex*

ER - receptores estrogênicos

EGF - fator de crescimento epidérmico

ENDO-1 - Proteína Endometriose -1

FADD - *Fas-associated death domain*

FGF - fator de crescimento de fibroblastos

fas-fasL – fas-fas Ligante

IA – Índice Apoptótico

ICAM - moléculas de adesão intracelular

IL – interleucina

IPC – Índice de Proliferação Celular

HSP - *Heat shock proteins*

LFA-1 - antígeno de função leucocitário

MEC - matriz extra celular

MMPs – metaloproteases

NK - *Natural Killer*

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintase

PCNA - *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PCR - proteína C reativa

PCR - *polymerase chain reaction*

PDGF - fator de crescimento derivado das plaquetas

PGE2 – prostaglandina E2

PR - receptores progestagênicos

ROS - espécies reativas de oxigênio

SAA - proteína sérica amilóide A

s-ICAM - moléculas de adesão intracelular - solúveis

TIMPs- *tissue inhibitors of metalloproteases*

TNF- α – fator de necrose tumoral – α

TUNEL - TdT – mediated dUTP – biotin nick end – labelling

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*

v-FLIP - *FADD-like ICE inhibitory proteins*

17 β – HSD - 17 β - hidroxíesteróide desidrogenase

RESUMO

RESUMO

Aguiar FM. Proliferação e Apoptose em endométrio tópico e ectópico de pacientes com endometriose peritoneal, ovariana e de septo reto-vaginal. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Tanto o endométrio tópico quanto o ectópico de mulheres com endometriose exibem uma série de anormalidades. A importância da proliferação celular e da apoptose na gênese da endometriose vem sendo estudada, mas os resultados ainda são controversos. O objetivo desse estudo foi comparar o padrão de proliferação celular e de apoptose no endométrio tópico e ectópico de pacientes com endometriose, avaliando separadamente as lesões peritoneais, os endometriomas ovarianos e as lesões de septo reto-vaginal.

Foi avaliada a expressão do marcador de proliferação celular PCNA e o marcador de apoptose *fas* em 22 amostras de endométrio tópico e ectópico de mulheres com endometriose, na fase proliferativa do ciclo menstrual (lesão peritoneal = 6 casos; lesão ovariana = 10 casos; lesão de septo reto-vaginal = 6 casos), avaliando separadamente tecido glandular e estromal.

Foi observado maior índice de proliferação celular (IPC) no componente glandular do tecido endometrial ectópico quando comparado ao tópico ($0,12 \pm 0,04$ e $0,18 \pm 0,06$, respectivamente) ($p= 0,034$). No tecido ectópico, foi observado maior IPC na lesão peritoneal quando comparada somente com a lesão de septo reto-vaginal ($0,14 \pm 0,07$ e $0,01 \pm 0,01$, respectivamente) ($p=0,009$). Na avaliação do estroma, encontramos maiores IPC no tecido tópico do que no ectópico ($0,05 \pm 0,01$ e $0,02 \pm 0,01$, respectivamente) ($p= 0,01$). O estroma do endométrio tópico das lesões peritoneais apresentou maior IPC que o correspondente da lesão ovariana ($0,09 \pm 0,02$ e $0,04 \pm$

0,01, respectivamente) ($p= 0,04$). Não foi observado diferença na expressão do marcador *fas* entre o endométrio tópico e ectópico, ou entre as diversas lesões endometrióticas.

Os resultados confirmam a participação de mecanismos de proliferação celular na gênese da endometriose, com especial importância nas lesões peritoneais, reforçando a teoria de que estas lesões sofrem regulação distinta dos seus mecanismos intrínsecos de crescimento e manutenção. A via de apoptose relacionada às proteínas de membrana da família do *fas/fas-L* parece não ser importante, mas futuros trabalhos são necessários para confirmar estes dados.

Palavras-chave: Endometriose, endométrio, proliferação celular, apoptose, PCNA, *fas*.

SUMMARY

SUMMARY

Aguiar FM. Proliferation and apoptosis in eutopic and ectopic endometrium from patients with peritoneal, ovarian and rectovaginal septum endometriosis. Master Tese – Ribeirão Preto Medical School Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Ectopic and eutopic endometrium of women with endometriosis show a variety of anomalies. Different studies have been performed to evaluate cell proliferation and apoptosis in endometriosis, but results are still controversial. In the present study we aimed to compare cell proliferation and apoptosis patterns in eutopic and ectopic endometrium in women suffering from endometriosis, evaluating separately peritoneal, ovarian and rectovaginal septum endometriosis. Here we studied the expression of cell proliferation protein PCNA and apoptosis protein *fas* in 22 proliferative eutopic and ectopic endometrium (peritoneal=6 cases; ovarian = 10 cases and rectovaginal septum = 6 cases), evaluating separately glandular and stromal cells.

Evaluating PCNA in glandular cells, the mean proliferation cell index (PCI) was significantly greater in ectopic tissue compared with eutopic ($0,12 \pm 0,04$ and $0,18 \pm 0,06$, respectively) ($p= 0,034$). Peritoneal endometriosis showed higher PCI than in rectovaginal septum endometriosis ($0,09 \pm 0,01$ and $0,13 \pm 0,07$, respectively) ($p=0,009$). PCI in stromal endometrium was higher in eutopic endometrium than in ectopic endometrium ($0,05 \pm 0,01$; and $0,02 \pm 0,01$, respectively) ($p: 0,01$). The stromal cells of the eutopic endometrium in peritoneal lesions showed higher PCI than in ovarian lesions ($0,09 \pm 0,02$ e $0,04 \pm 0,01$, respectively) ($p= 0,04$). No significant difference in expression of *fas* was seen between eutopic and ectopic endometrium, or between the three different endometriotic lesions. This study confirms the role of cell

proliferation in endometriosis, in special in peritoneal endometriosis. These data reinforce the concept that endometriotic lesions have different growth and maintenance profiles. According with our data, the apoptotic pathway related with *fas/fas-L* system is not important in the physiopathology of endometriosis. We need future data to confirm our finds.

Key-words: endometrium, endometriosis, cell proliferation, apoptosis, PCNA, *Fas*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Conceito

A endometriose se caracteriza pela presença de tecido endometrial ectópico, ou seja, fora da cavidade endometrial. Sua incidência é controversa devido ao grande número de casos não diagnosticados e devido à grande variação de acordo com a população estudada, sofrendo influência da idade, grau de instrução, presença de cirurgias abdomino-pélvicas prévias, padrão hormonal, entre outros fatores, mas acredita-se que cerca de 10% da população feminina global seja portadora de endometriose (Dabrosin *et al*, 2002) e que 50% das pacientes com infertilidade e dor pélvica tenham endometriose (Cornillie *et al*, 1990).

As repercussões clínicas desta patologia são extremamente variáveis e dependem da gravidade da endometriose e do local afetado. A dor pélvica crônica é bastante comum e é uma das maiores preocupações do ginecologista, visto que muitas vezes é incapacitante, com grave interferência na rotina da paciente e na qualidade de vida (Whiteside & Falcone, 2003; Falconnier & Chapron, 2005). Em casos severos a endometriose pode invadir tecidos de maneira mais profunda e produzir lesões de órgãos circunjacentes com comprometimento de alguns sistemas, como invasão de reto e sigmóide, com necessidade de reto-sigmoidectomia, e até mesmo de vasos pélvicos calibrosos, como a artéria uterina, com risco de vida para a paciente (Janicki *et al*, 2002).

A associação entre endometriose e infertilidade é inequívoca (Wheeler & Malinak, 1988; Wheeler, 1989). Entretanto, os mecanismos envolvidos ainda não estão totalmente esclarecidos. É facilmente explicável sua relação com endometriose quando há alteração da anatomia normal de estruturas pélvicas (Seibel & Zilberstein, 1998; Surrey & Halme, 1989). Todavia, quando isto não ocorre, como nos casos de

endometriose mínima e leve, encontra-se dificuldade para explicá-la. Neste caso, os mecanismos propostos compreendem: (1) alterações no microambiente folicular ou no oócito; (2) falência na implantação; (3) disfunção ovulatória; (4) defeitos imunológicos inclusive relacionados a processo auto-imune; (5) hiperativação dos macrófagos peritoneais (Wu & Ho *et al*, 2003); (6) alterações nas citocinas no fluido folicular e na circulação sanguínea; (7) síndrome do folículo luteinizado não roto; (8) alterações no desenvolvimento embrionário precoce; (9) apoptose celular aumentada em células da granulosa; e (10) alterações endócrinas como fase lútea inadequada e hiperprolactinemia (Moura *et al*, 1999). Estima-se que entre 30 e 50% das mulheres com endometriose tenham infertilidade, e que, até 58% das pacientes inférteis tenham endometriose em seus graus variados (Wheeler *et al*, 1989).

Cada vez mais busca-se entender os mecanismos etiopatogénéticos da endometriose, visando o desenvolvimento de novas drogas e abordagens terapêuticas, permitindo maior qualidade de vida e cura a estas mulheres.

1.2 Patogenia

A etiopatogenia da endometriose não está muito bem estabelecida embora venha sendo alvo de estudos em todos os campos de pesquisa. A teoria mais aceita para a etiologia da endometriose é a postulada por Sampson em 1927, que acreditava que as lesões endometrióticas surgiriam de aderências de tecido endometrial pós-menstrual na cavidade peritoneal e demais órgãos após fluxo tubário retrógrado (Sampson *et al*, 1927). Mas, apesar da teoria encontrar fundamento, há falhas em alguns pontos, como, por exemplo, a comprovação de que praticamente 90% das mulheres que têm trompas pérvias apresentam fluxo retrógrado e, no entanto, a maioria não apresenta endometriose (Halme *et al*, 1984; Abrão *et al*, 2000). Em vista disso, fica clara a importância de outros fatores além do fluxo retrógrado que permitam a implantação deste tecido na cavidade peritoneal.

Os estudos atuais se propõem a estudar as alterações moleculares tanto no endométrio tópico quanto no microambiente peritoneal que favorecem a formação das lesões endometrióticas. Parece que ambos encontram-se alterados, permitindo adesão, invasão, proliferação e crescimento das lesões.

Outras teorias tentam explicar a presença de lesões de endometriose fora da cavidade peritoneal. A metaplasia das células da linhagem peritoneal explica a endometriose em homens (Schrodt *et al*, 1980), em pré-púberes (Clark, 1948) em mulheres que nunca menstruaram (El-Mahgoub *et al*, 1980) e em sítios atípicos, como cavidade pleural (Hobbs *et al*, 1940). A constatação da presença de células endometriais viáveis na luz de vasos sanguíneos e linfáticos sugere que focos distantes de endometriose podem surgir a partir da disseminação de células endometriais por via

hematogênica ou linfática. Esta teoria explica lesões na pleura, cicatriz umbilical, espaço retro-peritoneal, vagina e colo do útero (Sampson, 1927; Javert, 1952).

A endometriose é uma doença complexa, com múltiplas manifestações e diferentes formas de apresentação. De acordo com Nisolle & Donnez, 1997, a endometriose peritoneal, o endometrioma ovariano e a endometriose de septo reto-vaginal podem ser consideradas três entidades diferentes, com origens etiopatogênicas e comportamentos clínicos diferentes.

A principal teoria para a gênese da endometriose peritoneal é a implantação direta de células menstruais refluídas na superfície peritoneal. Essa hipótese é corroborada por estudos morfométricos que sugerem que as lesões peritoneais vermelhas e o endométrio tópico são tecidos muito similares, podendo corresponder a células implantadas recentemente (Nisolle & Donnez, 1997). Laparoscopicamente são divididas em lesões vermelhas (em chama de vela, excrescências glandulares, lesões petequiais e áreas de hipervascularização) e lesões brancas (opacificações brancas, aderências sub-ovarianas, lesões tipo “café-com-leite” e defeitos peritoneais) (Abrão, 2000). As lesões vermelhas são mais vascularizadas e apresentam maior índice mitótico que as lesões brancas (Nisolle *et al*, 1993); provavelmente o aspecto macroscópico corresponde a um processo evolutivo das lesões, sendo que as vermelhas indicariam um primeiro estágio de implantação peritoneal, apresentando maior poder de invasão. Com o sangramento menstrual sucessivo, o endométrio ectópico descama e inicia-se uma reação inflamatória, produzindo um processo de cicatrização, podendo deformar o peritônio e resultar na formação de aderências (Nisolle *et al*, 1994).

Para a formação do endometrioma ovariano, existem três teorias: o acúmulo de debris menstruais e posterior invaginação e inversão do córtex para o interior do ovário, formando o cisto endometriótico (Hughesdon, 1957); por envolvimento secundário de

cistos funcionais por implantes localizados na superfície do ovário, ou por metaplasia celômica nos cistos de inclusão ovariano (Donnez & Nisolle, 1996).

A endometriose de septo reto-vaginal é uma das formas mais profundas da doença, podendo ter bases fisiopatogênicas distintas das demais lesões. Histologicamente, é composta essencialmente por células musculares, epitélio ativo e estroma escasso. A hiperplasia destas células musculares provoca reação inflamatória, retração e fibrose nos tecidos adjacentes. Para explicar a endometriose de septo reto-vaginal, duas teorias foram propostas: ou trata-se de metaplasia de remanescentes mullerianos daquela musculatura em glândulas e/ou estroma que formariam nódulos locais ou é a evolução natural de uma endometriose peritoneal que invadiu o septo reto-vaginal (Nisolle & Donnez, 1997).

Somente uma teoria não é capaz de explicar a totalidade dos casos de endometriose. Vários aspectos da patogenia da endometriose permanecem obscuros, sendo necessário um aprofundamento no entendimento de todos os fatores envolvidos na formação das lesões endometrióticas e na diferenciação destes três tipos de lesão.

1.2.1 - Proliferação Celular e Apoptose – a Homeostase Tecidual

A "homeostase tecidual" normalmente é produto de um equilíbrio entre mecanismos de destruição ou degradação celular (apoptose) e de proliferação celular. A apoptose, que ocorre na fase secretória e no período menstrual do ciclo feminino, é um dos processos cruciais no controle do *turn-over* celular no endométrio (Otsuki *et al*, 1994).

O ciclo de crescimento de uma célula consiste nas fases G1 (pré-síntese), S (síntese do DNA), G2 (pré-mitótico), M (mitose) e G0 (estado quiescente). Inúmeros

fatores podem estimular ou inibir a divisão e a morte celular, dependendo das necessidades da célula adaptar-se ao meio ambiente. Na endometriose, parece haver um desequilíbrio nesta homeostase, com maior proliferação celular nas lesões endometrióticas e menor apoptose, aumentando a viabilidade das lesões e, portanto, permitindo a sobrevivência e crescimentos das mesmas (Fujishita *et al*, 1999; Dmowski *et al*, 2001; Braun *et al.*, 2002).

Estudos mais recentes utilizando drogas bloqueadoras da proliferação celular ou indutoras de apoptose têm provado a importância destes mecanismos na etiopatogenia destas lesões, e aberto novas perspectivas para futuras intervenções terapêuticas.

1.2.1.1 - Proliferação Celular

Em relação ao comportamento do endométrio tópico de mulheres com endometriose, alguns estudos mostram maiores índices de proliferação celular, mas somente na fase proliferativa do ciclo menstrual, tanto no tecido glandular quanto estromal (Shuang-fang Li, 1993; Wingfield *et al*, 1995; Johnson *et al*, 2005; Buriev *et al*, 2006), porém outros trabalhos não encontraram diferenças significantes (Jurgensen A, 1996; Scotti S, 2000; Beliard *et al*, 2004;).

O comportamento das lesões endometrióticas em relação à proliferação celular também ainda não é de todo conhecido. Um dos estudos pioneiros foi o de Shuan-fang Li, 1993, que encontrou maior IPC através de PCNA no tecido glandular das lesões endometrióticas, ao longo de todo ciclo menstrual. Ao contrário, outros estudos não mostram diferenças entre os endométrios tópicos e ectópicos, ou mesmo mostram menor proliferação no tecido ectópico, tanto no tecido glandular quanto no estroma. Outra característica observada no tecido ectópico é a perda de variação ao longo do

ciclo menstrual (Jones *et al*, 1995; Nisolle *et al*, 1997; Scotti *et al*, 2000; Beliard *et al*, 2004).

Novas drogas com ação anti-proliferativa vêm sendo testadas *in vitro*, com resultados promissores. Laschke, 2006, estudou a ação da rapamicina, um conhecido anti-fúngico e imunossupressor, em lesões endometrióticas induzidas em hamsters. A administração desta droga resultou na redução do tamanho das lesões, associado a uma redução na produção de VEGF e menor marcação celular pelo PCNA (Laschke *et al*, 2006). O efeito das estatinas também foi avaliado em células endometrióticas estromais em meio de cultura, sendo observado redução da proliferação celular após administração da droga (Piotrowski *et al*, 2006).

Futuramente, drogas que atuam nos mecanismos de controle da proliferação celular poderão ser utilizadas *in vivo*, alargando as opções terapêuticas na endometriose.

1.2.1.2 - Apoptose celular

A apoptose é um processo de morte celular programada que acontece após estímulo específico, no qual há condensação da cromatina e fragmentação do DNA, do núcleo e da célula em si, com posterior fagocitose por macrófagos. A apoptose é controlada pela proporção de BCL2 e BAX, duas proteínas intracelulares, sendo que a BCL2 tem função de bloquear a apoptose, aumentando a sobrevivência da célula e a BAX tem função contra-reguladora, acelerando o processo de apoptose (Nogueira *et al*, 2000). A função exata da BCL-2 é desconhecida. No endométrio, a proteína BCL-2 tem sua máxima expressão durante a fase proliferativa, diminuindo gradualmente até a fase secretora, quando praticamente não é encontrada, coincidindo com o aumento da incidência de apoptose nessa fase do ciclo menstrual.

Meresman *et al*, 2000, descreveu uma maior expressão de BCL-2 e ausência da expressão de BAX na fase proliferativa tardia no endométrio tópico de mulheres com endometriose comparado com o endométrio de mulheres normais. Tem sido observado um aumento do número de macrófagos BCL2+ em tecido endometrial ectópico analisado por imunohistoquímica, sugerindo maior "resistência" do tecido (Nogueira *et al*, 2000). Além disso, também tem sido descrita uma redução do número de macrófagos e de células apoptóticas no endométrio tópico de pacientes com endometriose quando comparado com endométrio de pacientes sem a doença, podendo justificar um aumento na viabilidade deste tecido para implantação futura (Braun *et al*, 2002).

Mc Laren *et al*, 1997, mediram as proteínas BCL-2 e BAX em tecido endometrial e em macrófagos de líquido peritoneal de pacientes com endometriose e observaram que, em tecido endometrial tópico ou ectópico, a expressão do BCL-2 acompanha o ciclo menstrual, com aumento na fase proliferativa e declínio até níveis não mensuráveis na segunda metade da fase secretora, enquanto a expressão do BAX não se altera, independentemente da fase do ciclo ou tecido endometrial tópico ou ectópico. Adicionalmente, macrófagos expressando a proteína BCL-2 estavam presentes em número significativamente maior em pacientes com endometriose e apresentavam variação cíclica, com declínio de seu número até próximo de valores encontrados em mulheres sem endometriose, na fase secretora. Nas pacientes sem endometriose, não houve variação cíclica destes macrófagos. Em relação aos macrófagos que expressavam proteína BAX, um número significativo maior deles foi encontrado em pacientes sem endometriose, porém em ambos os grupos, sem alterações com a fase do ciclo. O estudo imunohistoquímico revelou população de macrófagos BCL-2 positivo e BAX negativo presentes apenas em tecido ectópico endometrial (presentes em todas as fases do ciclo,

sem descrição de variações quantitativas de acordo com a fase do ciclo) e que a expressão da proteína BCL-2 com a ausência da proteína BAX poderia conferir a estas células maior resistência a estímulos apoptóticos, aumentando a expectativa de vida destas células. Postularam ainda que, apesar de ser reconhecido que a ativação de macrófagos, freqüentemente, resultasse em apoptose, a maior quantidade de macrófagos BCL-2 positivos em pacientes com endometriose poderia resultar em maior número de células que sobrevivam ao processo de ativação, sendo, portanto, um dos mecanismos pelo qual se observa maior quantidade de macrófagos ativados no líquido peritoneal de pacientes com endometriose.

O Sistema fas-fas ligante

Além dessas duas proteínas reguladoras, a apoptose pode ser regulada através da ativação de receptores chamados “*death receptors*”, ou seja, receptores de morte. Entre esses receptores, temos as proteínas do sistema *fas-fas ligante (fas-fasL)*. Enquanto o *fas* é expresso na maioria das células do organismo, seu ligante *fasL* é observado nas membranas das células citotóxicas da resposta imune, hepatócitos, em linfócitos T ativados e em células oculares. A apoptose via *fas-fasL* é desencadeada pela interação entre *fas* e *fasL*. Quando ela ocorre, os receptores formam agregados que, na forma de trímeros, ligam-se à proteína adaptadora FADD (*Fas-associated death domain*) presente no citoplasma. Ocorre, então, a ligação dessas moléculas à pró-caspase-8, resultando na formação de um complexo denominado DISC (*Death Inducing Signalling Complex*), que culmina na auto-clivagem e ativação da caspase-8. A caspase-8 pode, assim, diretamente ou pela via mitocondrial, ativar a caspase-3 efetora, o que resulta na apoptose celular. (Medema *et al*, 1997; Chinnaiyan *et al*, 1995; Yanagisawa *et al*, 1997). O recrutamento e ativação da pró-caspase-8 são regulados por proteínas anti-

apoptóticas, como o v-FLIP (*FADD-like ICE inhibitory proteins*) and c-FLIP. Essas proteínas competem com a caspase-8 pelo sítio de ligação do complexo Fas-FADD e inibem a apoptose celular (Deveraux *et al*, 1998) (Figura 1).

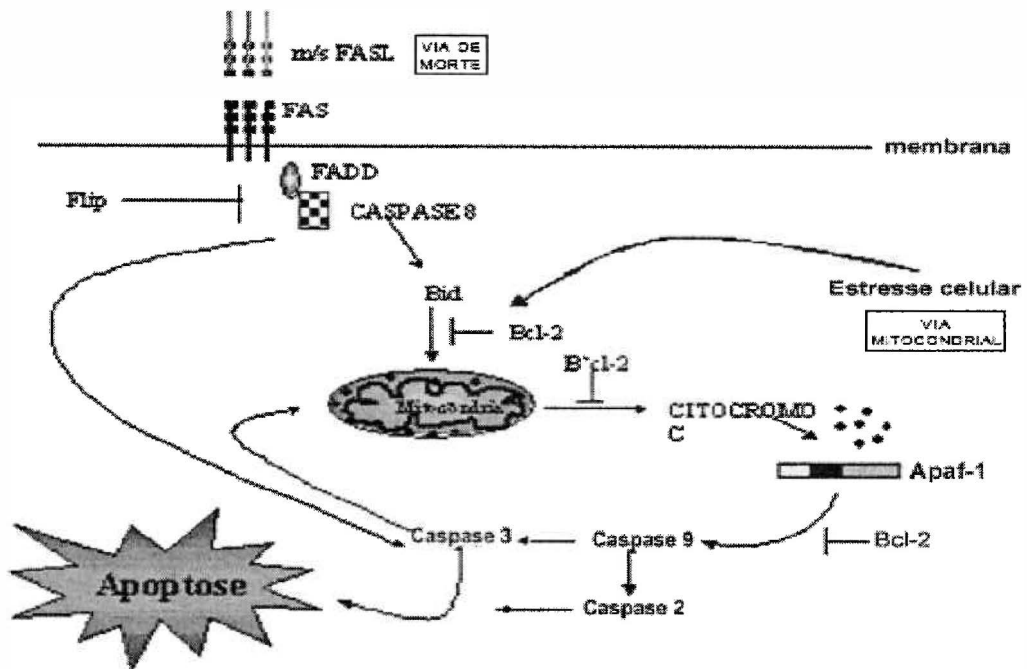


Figura 1: Esquema do processo de ativação da apoptose pela via dos receptores *fas-fasL* e pela via mitocondrial.

Embora o amplo espectro de ação do sistema *fas-fasL* não tenha sido de todo determinado, este sistema já foi bem determinado nos processos de imunomodulação. Tanto o *fas* quanto seu ligante são super-expressos na superfície celular dos linfócitos T ativados, tendo papel importante na resposta imune. Apesar desta super-expressão, estes linfócitos só se tornam sensíveis à apoptose após um período de alguns dias de sensibilização. Esta sensibilização é facilitada, pelo menos em parte, pela redução dos níveis de BCL-2 e BCL-X. Desta forma, estes linfócitos citotóxicos têm sua ação liberada por um curto período de tempo, sendo logo em seguida eliminadas via apoptose

induzida pelo sistema *fas-fasL* (Peter *et al*, 1997). Este mecanismo previne o acúmulo de células efectoras auto-ímmunes direcionadas a auto-antígenos.

A importância do sistema *fas-fasL* na imunomodulação normal é demonstrada pela presença de doenças auto-ímmunes e linfoproliferativas em ratos que apresentam mutações tanto do *fas* quanto do *fasL* (Nagata, 1997). Em humanos, várias mutações diferentes nos genes do sistema *fas-fasL* já foram demonstradas em crianças com síndromes auto-ímmunes linfoproliferativas, uma rara condição auto-ímmune com maciça linfadenopatia (Rieux-Laucat *et al*, 1995; Fischer *et al*, 1995). Estes achados enfatizam a importância crucial deste sistema na homeostase ímmune e na tolerância periférica.

Recentemente, a expressão do *fasL* foi relatada em células não-ímmunes, principalmente em tecidos onde processos ímmunológicos ocorrem com muita importância, criando um status ímmunológico privilegiado, permitindo maior sobrevivência celular.

Existem relatos de expressão de *fasL* em macrófagos e em células da MEC presentes em estroma de tecido endometriótico, assim como no fluido peritoneal de mulheres com endometriose (Selam *et al*, 2002). Além disso, os fatores de crescimento derivados de macrófagos presentes no fluido peritoneal de mulheres com endometriose parecem estimular a expressão de *fasL*.

O tecido endometrial típico de mulheres com endometriose apresentam maior expressão de *fasL* quando comparado com endométrio de mulheres normais. Esta up-regulação do *fasL* leva a apoptose dos linfócitos T, facilitando o desenvolvimento das lesões endometrióticas, já que o *clearance* destas células ficaria prejudicado pela falha do sistema ímmune. A IL-8, PDGF e TGF- β 1 presente em grande quantidade no fluido peritoneal de mulheres com endometriose também pode levar a uma super-expressão de moléculas *fasL* (Garcia e Velasco *et al*, 2003).

Garcia e Velasco, 2003, também observaram que mulheres com endometriose moderada a severa apresentam altos níveis de *fasL* tanto no soro quanto no fluido peritoneal quando comparados com controles saudáveis, reafirmando mais uma vez o papel deste sistema na sobrevivência e na implantação de tecido endometrial ectópico.

Alguns estudos têm avaliado apoptose através da técnica do TUNEL (TdT – mediated dUTP – biotin nick end – labelling). Dmowski et al, 2001, observaram menor índice apoptótico entre as células glandulares, mas não nas estromais de pacientes com endometriose quando comparadas a mulheres saudáveis. Em mulheres normais, o índice apoptótico foi maior durante a fase secretora/ menstrual e fase proliferativa inicial; em mulheres com endometriose esta ciclicidade não foi observada. Houve uma tendência a menores índices apoptóticos em fases mais avançadas da doença, porém sem significância estatística.

Outros estudos procuraram correlacionar índice apoptótico com os diferentes tipos de lesão de endometriose. Poucos trabalhos avaliaram o padrão de marcação do fas nas lesões endometrióticas. Harada et al, 1996, não encontrou diferença entre o tecido tópico e ectópico quando analisou a marcação do fas. Watanabe et al, 1997, observou marcação pelo fas somente nas células glandulares e não nas estromais, e perda da variação cíclica ao longo das fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual, tanto no tecido tópico quanto ectópico. Não houve diferença na marcação do fas entre o tecido tópico e ectópico.

Dufournet *et al*, 2005, estudou vários marcadores imunohistoquímicos para apoptose (p53, p21, BAX, BCL-2 e *fas*) no endométrio tópico e nos três tipos de lesão endometriótica. Na análise qualitativa, estes autores encontraram diferenças entre as lesões somente nos marcadores BCL-2 e *fas*. A lesão peritoneal diferiu das demais com maior marcação pelo BCL-2 e pelo *fas*. Na avaliação semi-quantitativa, a expressão do

BCL-2 foi menor na lesão ovariana quando comparada com as demais, resultados compatíveis com relatos prévios (Suganuma *et al*, 1997; Mc Laren *et al*, 1997, Nezhat *et al*, 2002). Este autor também encontrou altos índices de BCL-2 na lesão colon-retal, sugerindo uma menor sensibilidade deste tecido a apoptose.

As proteínas de choque quente (*Heat shock proteins* - HSP) são proteínas sintetizadas como resposta a uma série de estímulos físicos e químicos, como choque, esteróides e dano oxidativo. Estudos sugerem que as HSP estão diretamente relacionadas a componentes do sistema imune, como processamento, apresentação e ligação de antígenos (Sharpe-Timms, 2001). Algumas HSP variam de acordo com a fase do ciclo menstrual; as HSP 27, 60 e 70 estão aumentadas na fase secretora (Tabibzadebh *et al*, 1996). Estudos recentes mostram maior expressão de HSP 27 e 70 no endométrio de mulheres com endometriose quando comparadas a mulheres saudáveis; entretanto, foi encontrada uma expressão menor destas proteínas no endométrio ectópico quando comparada com o endométrio típico (Nip *et al*, 1994; Ota *et al*, 1997). Estes achados sugerem que as HSP protegem as células de sofrerem apoptose, reduzindo os efeitos citotóxicos das citocinas acumuladas na fase secretória.

Em resumo, vários autores mostraram uma redução significativa da apoptose no endométrio de mulheres com endometriose quando comparado com controles normais, principalmente nas fases secretora, menstrual e fase proliferativa inicial, e também uma redução da apoptose no endométrio ectópico quando comparado com o endométrio típico nas mulheres com endometriose, porém existem dados que não corroboram com estes achados.

1.2.2 - Como as células endometriais refluxidas aderem ao peritônio pélvico

Durante a menstruação, ocorre fluxo retrógrado de células endometriais viáveis pelas trompas. Os mecanismos que envolvem a adesão destas células na superfície peritoneal têm sido exaustivamente estudados (Witz, 2003). Fazem parte da constituição da matriz extra celular (MEC): o colágeno, a elastina, os proteoglicanos e as glicoproteínas adesivas (fibronectinas, lamininas, vitronectinas, osteopontina e fibrinogênio). As células peritoneais expressam várias moléculas que permitem a adesão a estes componentes, como integrinas, caderinas, selectinas e moléculas da superfamília de imunoglobulinas.

Vários autores encontraram maior expressão de integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, além de E-caderinas no endométrio tóxico de pacientes com endometriose (Koks *et al.*, 2000; Beliard *et al.*, 1997; Grosskinsk *et al.*, 1995). Todos estes estudos apontam para uma maior capacidade de aderência das células endometriais de mulheres com endometriose à superfície peritoneal; este fenômeno de adesão celular seria o primeiro dentro da cascata de eventos envolvidos na formação das lesões endometrióticas.

1.2.3 - Como as células endometriais aderidas invadem a MEC

Após o processo de adesão, a invasão da MEC é necessária para o crescimento dos implantes endometrióticos. Acredita-se que esta invasão ocorra devido a um desequilíbrio entre enzimas de degradação de componentes da matriz extracelular e seus reguladores. Estudos mostram que várias enzimas podem estar envolvidas nesse processo, em especial as metaloproteases e a catepsina.

As metaloproteases (MMPs) são enzimas zinco-dependentes, capazes de degradar todos os componentes da MEC, dentre as quais podemos citar as colagenases, as gelatinases e as lisinas estromais (Osteen KG *et al*, 2003). No processo de remodelação da MEC, ocorre um balanço entre a expressão das MMPs e de seus inibidores (TIMPs- *tissue inhibitors of metalloproteases*). A expressão gênica das MMPs é induzida por citocinas inflamatórias, incluindo IL-1, IL-6 e TNF- α , além de fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (Malik *et al*, 1996; Schonbeck *et al*, 1997).

Vários estudos têm observado um aumento de algumas MMPs e redução de TIMPs produzidos pelo endométrio tópico e ectópico de pacientes com endometriose, o que conferiria uma maior capacidade invasora do tecido refluído do fluxo menstrual retrógrado (Osteen *et al*, 2003). As principais MMPs envolvidas na endometriose são a MMP-1, MMP-3 e MMP-7, aumentadas principalmente durante a segunda fase do ciclo menstrual, correspondendo a uma resposta falha à ação da progesterona. Além disso, parece haver uma menor expressão do RNA-m da TIMP-3 no endométrio tópico de pacientes com endometriose. Há também uma menor concentração da TIMP-1 no fluido peritoneal de mulheres com endometriose (Osteen *et al*, 2003). A identificação das alterações moleculares que levam a este desbalanço entre MMPs e TIMPs pode abrir caminhos para a descoberta de novos regimes terapêuticos.

1.2.4 - Como os novos implantes crescem e sobrevivem

Acredita-se que após a invasão peritoneal, a viabilidade do foco endometriótico seja mantida pela neoformação vascular local desenvolvida sob estímulo de substâncias angiogênicas como o VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular). O VEGF é

produzido e secretado no fluido peritoneal por macrófagos ali presentes, e tem a capacidade de promover crescimento endotelial, aumento da permeabilidade vascular e modulação da secreção de enzimas proteolíticas relacionadas a angiogênese.

No endométrio normal, os níveis máximos de RMA-m de VEGF são atingidos na fase proliferativa final e secretora (Shifren *et al*, 1996). Recentes estudos apontam para um papel modulador dos estrógenos e progestágenos na ação do VEGF (Shifren *et al*, 1996; Cullinan *et al*, 1993). Hipóxia, IL-1 β , PDGF, EGF e PGE2 aumentam a expressão do VEGF (Lebovic *et al*, 2001). Há estudos descrevendo a presença de VEGF aumentado no fluido peritoneal e no soro de pacientes com endometriose, e sua concentração pode estar relacionada com o estadiamento da endometriose (Shifren *et al*, 1996; Nogueira *et al.*, 2000). Mulheres com endometriose também apresentam maiores concentrações de VEGF no tecido endometrial tópico quando comparadas com mulheres controles, na fase secretora do ciclo menstrual (Donnez *et al*, 1995).

Todas essas alterações favorecem a implantação do tecido ectópico e o estabelecimento da lesão

1.2.5 - O sistema imune

Em situação fisiológica o tecido endometrial refluído pelas trompas é fagocitado e eliminado da cavidade pélvica sem maiores repercussões. Nas pacientes com endometriose esta resposta imune está prejudicada.

Alterações tanto no sistema imune celular quanto humoral são descritas. O fluido peritoneal de pacientes com endometriose apresenta um maior número de macrófagos, porém com menor atividade fagocítica, além de produzirem maior quantidade de fatores de crescimento e citocinas que estimulam a adesão celular e expressão de MMPs,

favorecendo a formação dos implantes endometrióticos (Halme *et al.*, 1983; Zeller *et al.*, 1987; Dunselman *et al.*, 1988). As células NK (*Natural Killer*) também apresentam uma menor capacidade de *clearance* das células regurgitadas (Wilson *et al.*, 1994). O endométrio tópico de mulheres com endometriose libera uma grande quantidade de substâncias inibidoras das células NK, quando comparado com o endométrio de mulheres normais (Mizumoto *et al.*, 1996; Somigliana *et al.*, 1996). Entre os linfócitos, há uma dominância na atividade dos linfócitos da subpopulação Th2 em relação à Th1 (Wu & Ho *et al.*, 2003).

As células endometriais, *in vitro*, liberam moléculas de adesão intracelular - solúveis (s-ICAM), principalmente durante a fase proliferativa do ciclo menstrual. Esta molécula é capaz de modular a ação de linfócitos CD8⁺ e células NK, assim como foi demonstrado em certos tipos de melanomas. Os s-ICAM competem com os ICAM na ligação com uma proteína que torna os leucócitos ativos, o antígeno de função leucocitário (LFA-1). Quando os sICAM se ligam aos LFA-1, eles tornam os leucócitos menos expostos a ligação com os ICAM presentes na superfície celular, prevenindo a ativação destes leucócitos. Estudos mostram que as células estromais do endométrio de mulheres com endometriose expressam altas concentrações de sICAM, quando comparadas a mulheres sem a doença. Além disso, a expressão de s-ICAM é ainda maior no endométrio ectópico do que no tópico neste grupo de mulheres (Somigliana *et al.*, 1996; Vigano *et al.*, 1998).

Quanto à imunidade humoral, sugere-se a associação entre endometriose e doenças auto-imunes. Em estudo realizado com 313 mulheres inférteis com endometriose (261 estágios I e II; 62 estágios III e IV) e 101 mulheres inférteis sem endometriose, houve níveis mais elevados de auto-anticorpos do tipo antifosfolípide contra inositol, cardiolipina, etanolrunida e J32glicoproteína nas pacientes com

endometriose, sendo mais exuberante naquelas nos estágios I e II. Além disso, 40% das pacientes com endometriose graus mínimo e leve apresentaram anticorpos anti-zona pelúcida (Gallová *et al.*, 2002). Adicionalmente, níveis elevados de citocinas no fluido peritoneal de pacientes com endometriose foram relatados em diversos estudos. Entre elas estão IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF, TNF α , TGF β (Wu & Ho *et al.*, 2003) (Figura 2).

A IL-6 corresponde a uma interleucina das mais importantes na etiopatogenia da endometriose. Está envolvida com a produção esteroidogênica ovariana, foliculogênese e implantação embrionária, apresenta atividade multifuncional e possui efeitos angiogênicos, induzindo a expressão de VEGF. A IL-6 também estimula a produção da aromatase em células adiposas (Witz *et al.*, 2000), e, em elevadas concentrações, é embriotóxica em ratos (Wu & Ho *et al.*, 2003) (Figura 2). Ela é produzida pelas células do sistema imune, células endometriais glandulares e estromais. Foi observado que o estroma derivado de endometriomas ovarianos apresenta níveis elevados de IL-6 quando comparados com níveis de estroma derivados de endométrios normais. Por outro lado, o endométrio tópico de mulheres com endometriose apresenta níveis intermediários de IL-6 (Tseng *et al.*, 1996).

A IL-1 exerce um papel importante na inflamação e no sistema imune. Ela é secretada principalmente por macrófagos e monócitos ativados, além de linfócitos B, T e células NK. Existem duas moléculas distintas de IL-1, provenientes de dois genes diferentes: a IL-1 α e a IL-1 β . A IL-1 β é secretada principalmente pelos macrófagos peritoneais e encontra-se em níveis elevados na endometriose, podendo exercer importante papel na neovascularização dos focos de endometriose. Após exposição a esta interleucina, as células endometriais respondem aumentando a expressão do RNA-m das proteínas VEGF e IL-6; este fenômeno não ocorre no endométrio de mulheres

normais. A IL-1 β também aumenta os níveis de sICAM-1, interferindo nos mecanismos de sobrevivência celular (Lebovic *et al*, 2000; Vigano *et al*, 1998).

A IL-8 é um potente fator angiogênico produzido por células mesoteliais, macrófagos e células endometriais. Estudos têm demonstrado que a IL-8 estimula a proliferação de células endometriais e células estromais endometrióticas (Iwabe *et al*, 1998; Arici *et al* 1998). Outros estudos mostram que a IL-8 está elevada no fluido peritoneal de mulheres com endometriose e seus níveis estão relacionados com a severidade da doença (Gasvani *et al*, 1998; Arici *et al*, 1996). A IL-8 também estimula a adesão celular à fibronectina, sugerindo um possível papel nos eventos que iniciam a doença (Garcia-Velasco *et al*, 1999).

Por todo o processo inflamatório que se desenvolve no ambiente intra-cavitário abdominal é de se esperar que alguns marcadores de atividade inflamatória como o PCR (proteína C reativa) e a SAA (proteína sérica amilóide A), estejam aumentados na avaliação destas pacientes, marcadores estes que são inespecíficos no diagnóstico etiológico, mas que quando associados a outros fatores diagnósticos podem indicar atividade da doença e podem ser úteis no seguimento do controle da resposta terapêutica. Os níveis destes marcadores inflamatórios em pacientes com endometriose são maiores no período menstrual do que na fase folicular tardia, sugerindo relação com o processo inflamatório gerado pelo sangramento menstrual dos focos de endometriose. Em alguns casos o nível sérico de SAA pode sugerir doença avançada, o que auxilia no planejamento da abordagem cirúrgica destas pacientes (Abrão *et al*, 1997).

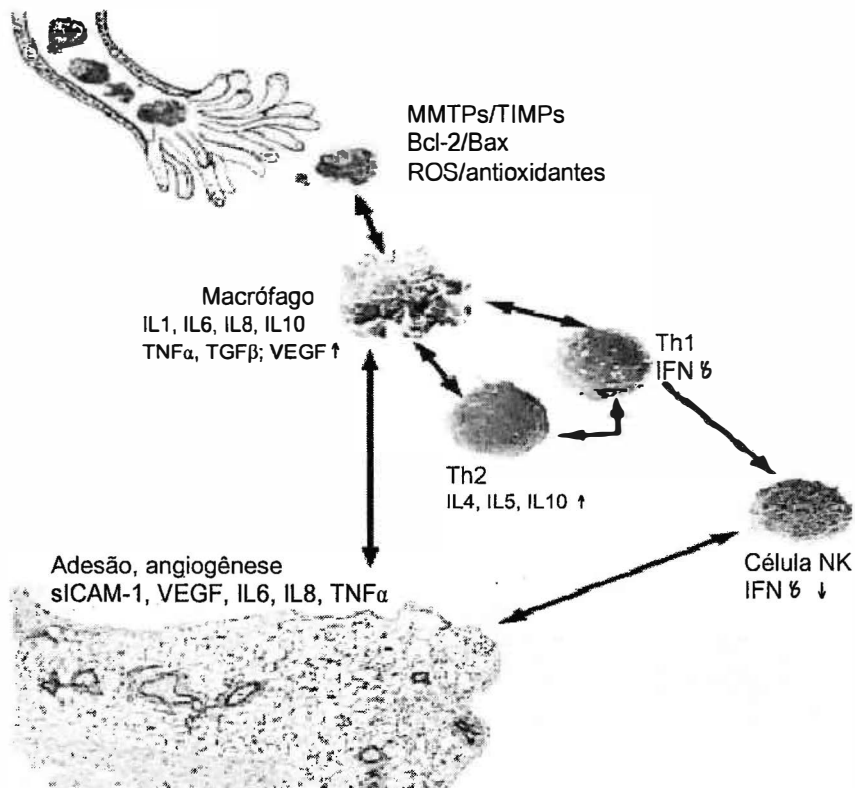


Figura 2: Possíveis alterações fisiopatológicas na cavidade peritoneal de mulheres com endometriose. O endométrio anormal da endometriose em ROS (espécies reativas de oxigênio), antioxidantes, metaloproteinases e seus inibidores (MMPs e TIMPs). Th1 = subpopulação de linfócitos 1; Th2 = subpopulação de linfócitos 2. sICAM-1: molécula de adesão intercelular forma solúvel. VEGF= fator de crescimento vascular endotelial. Bcl-2 e Bax = proteínas anti-apoptóticas. (adaptado de Wu & Ho, 2003).

1.2.6 - Estresse Oxidativo

Acredita-se que a cavidade peritoneal de pacientes com endometriose represente um ambiente pró-oxidante, com produção de substâncias denominadas espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem contribuir para a reação inflamatória associada à endometriose (Langendonckt *et al.*, 2002). As espécies reativas de oxigênio são substâncias intermediárias produzidas normalmente no metabolismo do oxigênio e, para proteção contra seus efeitos deletérios, as células desenvolveram uma variedade de sistemas antioxidantes. Os antioxidantes enzimáticos

correspondem à superóxido dismutase, catalase, glutathione redutase e os antioxidantes não enzimáticos à vitamina E, vitamina C, taurina e glutathione. Por outro lado, moléculas como o óxido nítrico, os metais e os poluentes ambientais são tidos como pró-oxidantes. Quando ocorre um predomínio destas espécies reativas de oxigênio em detrimento dos antioxidantes, há o estresse oxidativo celular (Langendonck *et al.*, 2002).

Existem algumas evidências de estresse oxidativo na endometriose: (1) A enzima óxido nítrico-sintetase encontra-se super expressa levando a uma maior produção de óxido nítrico; (2) aumento da peroxidação lipídica com produção de produtos reativos como o malonaldeído e lisofosfatidilcolina; (3) expressão aumentada de enzimas antioxidantes no endométrio de pacientes com endometriose, que ocorreria em resposta à presença de maior quantidade de espécies reativas de oxigênio; (4) níveis reduzidos de vitamina E no fluido peritoneal de mulheres com endometriose consumida durante reações de oxidação; (5) presença de indutores potenciais de estresse oxidativo na cavidade peritoneal como eritrócitos, debris celulares e macrófagos (Langendonck *et al.*, 2002; Szczepanska *et al.*, 2003). Os efeitos sobre a fertilidade residem na toxicidade do fluido peritoneal sobre os espermatozoides, defeitos na ovulação e alterações no desenvolvimento embrionário pré-implantação e implantação (Langendonck *et al.*, 2002) (Figura 3).

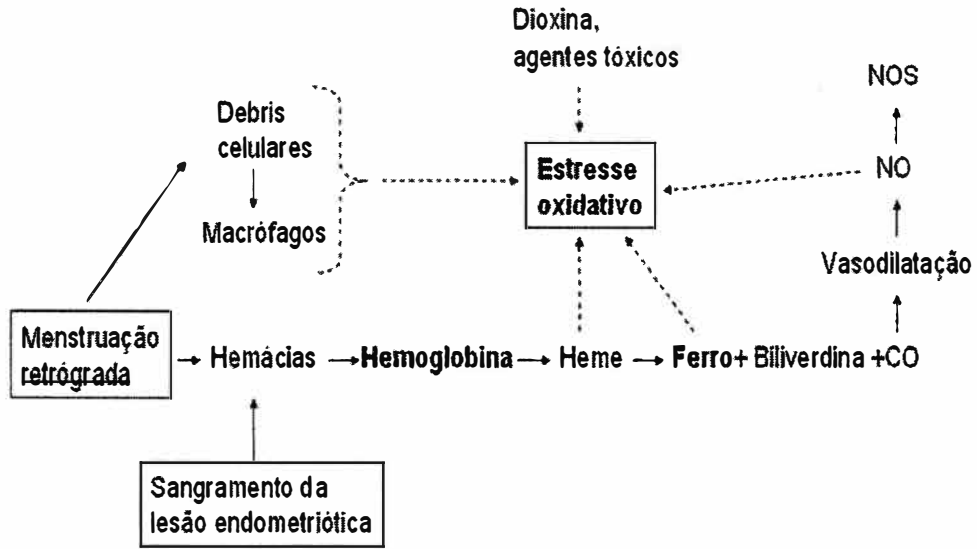


Figura 3: Mecanismo de estresse oxidativo na endometriose. (adaptado de Langendonck *et al.*, 2002). (CO = dióxido de carbono; NO = óxido nítrico; NOS = óxido nítrico sintase).

1.2.7 - Os fatores hormonais na gênese da endometriose

A endometriose é, sabidamente, uma doença estrogênio-dependente. Os estudos atuais de biologia molecular revelam que existem tipos distintos de receptores estrogênicos e progesterônicos. Os receptores estrogênicos (ER) estão presentes principalmente na fase proliferativa tardia e secretora inicial, enquanto os receptores progestagênicos (PR) aumentam um pouco mais tardiamente, na fase média e final da fase secretória (Lessey *et al.*, 1988).

Existem duas isoformas de receptores estrogênicos, os ER- α e os ER- β , ambos presentes nas células epiteliais e estromais do endométrio humano. Igualmente, os receptores progestagênicos também se apresentam de duas isoformas, os PR-A e PR-B. Alterações na expressão destes subtipos de receptores têm sido descritas em células isoladas e em tecidos de mulheres com endometriose (Mc Donnell *et al.*, 1995; Attia *et al.*,

2000; Brandenberg *et al*, 1999). Estas alterações levam a uma maior exposição ao estrogênio e uma menor sensibilidade à ação da progesterona.

A aromatase, por sua vez, corresponde a uma enzima responsável por catalisar a transformação de andrógenos (testosterona, androstenediona) em estrógenos (estradiol, estrona, respectivamente). Existem indicativos de alterações desta enzima na endometriose: (1) trata-se de uma doença do menacme, portanto, sua etiopatogenia possivelmente se relaciona com a esteroidogênese e a aromatase está diretamente envolvida neste processo (Bulun *et al.*, 2002;) (2) a aromatase é uma enzima intrinsecamente relacionada à esteroidogênese folicular e sabe-se que um microambiente estrogênico é vital para a dominância folicular, influenciando a qualidade oocitária e possivelmente a infertilidade na endometriose (Speroff *et al*,1999) e, (3) alterações das concentrações da aromatase na endometriose já foram relatadas: níveis muito elevados da aromatase foram encontrados, por meio de PCR (*polymerase chain reaction*), em implantes endometrióticos e em endometriomas (Noble *et al*, 1996). Também foi detectado RNA-m da aromatase em endométrio eutópico de pacientes com endometriose, não sendo encontrado em mulheres sem a doença (Bulun *et al*, 1995).

A prostaglandina E2 (PGE2) é um potente estimulador da aromatase; o estrogênio, produto final da reação, por sua vez, é um potente estimulador da PGE2, formando assim um ciclo vicioso que permite altas concentrações locais de estrogênio nas lesões (Bulun *et al*, 1998). Estas informações podem embasar futuras intervenções terapêuticas, como alguns estudos que já mostram alívio da dor e redução do tamanho dos implantes com o uso de inibidores da aromatase (Attar *et al*, 2006; Ailawadi *et al*, 2004; Amsterdam *et al*, 2005; Soysal *et al*, 2004).

Além disso, na endometriose encontramos baixos níveis de 17 β - hidroxisteróide desidrogenase (17 β – HSD) tipo 2, uma enzima que converte o estradiol, um estrógeno

potente, em estrona, um estrógeno com menor atividade biológica. Esta enzima também é induzida pela ação da progesterona. Por outro lado, a 17 β – HSD tipo 1, que faz a reação oposta, ou seja, converte estrona em estradiol, está expressa na endometriose (Andersson *et al*, 1997; Zeitoun *et al*, 1998).

1.2.8 - Marcadores séricos e Regulação Gênica na Endometriose

O CA-125, uma glicoproteína de alto peso molecular com menor quantidade de carboidratos que de mucinas (Jacob *et al*, 1989), é um determinante antigênico expresso na superfície celular dos derivados do epitélio celômico (como o peritônio, pericárdio, pleura e trato genital); foi originalmente descrito como marcador para tumores epiteliais de ovário, principalmente os cistoadenocarcinomas (Bast *et al*, 1983). Posteriormente Nilof, em 1984 descreveu pela primeira vez o aumento dos níveis séricos deste marcador em pacientes com endometriose (Niloff *et al*, 1984). A relação da endometriose com o CA-125 é justificada tanto pela maior concentração desse marcador no endométrio ectópico comparado ao tópico como pela reação inflamatória associada ao processo, alterando a capilaridade do endotélio e facilitando a chegada do CA-125 à circulação (Masahashi *et al*, 1988 e Barbieri *et al*, 1986). Estudos mostram que em mulheres com endometriose a expressão do CA-125 está aumentada em 2 a 4 vezes no endométrio tópico, tanto na fase secretória inicial quanto tardia do ciclo menstrual (McBean *et al*, 1993).

Vários trabalhos têm relatado o uso do CA-125 como marcador para diagnóstico e, principalmente, para seguimento de mulheres em tratamento para a endometriose. A elevação deste marcador nas pacientes com endometriose está presente em cerca de 50% dos casos (Watanabe *et al*, 1990). Alguns autores sugerem existir uma correlação

entre os níveis séricos do CA-125 e a atividade proliferativa das células epiteliais das lesões endometrióticas (Toki *et al*, 2000).

Recentemente, o CA 19-9 vem sendo citado também como marcador para endometriose. Trata-se de antígeno do grupo sanguíneo Lewis^a sialilado expresso como um monosialogangliosídeo em glicoproteínas mucosas secretadas em tumores gastrointestinais, pancreáticos e pulmonares (Magnani *et al*, 1983). É uma glicoproteína de alto peso molecular amplamente utilizada como marcador sérico para a identificação destes tumores (Tatsuya *et al*, 2002). A sua utilização como marcador de tumores ovarianos (cistoadenocarcinomas mucinosos) e de endometriose vem sendo observada por alguns autores (Tatsuya *et al*, 2002), estando presente em níveis aumentados em 52% das pacientes (Watanabe *et al*, 1990 e Matalliotakis *et al*, 1998).

A sensibilidade do CA-125 e do CA 19-9 é da ordem de cerca de 50% cada um isoladamente para identificação de pacientes com endometriose, mas segundo Watanabe (Watanabe *et al*, 1990), a associação dos dois marcadores séricos aumenta a sensibilidade para 71,4%. Mesmo assim, a sua aplicação e interpretação devem ser sempre acompanhadas da avaliação clínica da paciente e muitas vezes de outros exames complementares, de imagem e até mesmo da laparoscopia, e na prática são mais utilizados para seguimento de pacientes em uso de alguma terapia, seja ela clínica ou cirúrgica.

A Proteína Endometriose -1 (ENDO-1) é uma haptoglobulina produzida e secretada particularmente pelo tecido endometrial ectópico (Sharpe-Timms *et al*, 1998). Sua expressão está aumentada neste tecido quando comparada com o tecido endometrial tópico. Acredita-se que esta proteína atue nos processos inflamatórios, imunes e na neoangiogênese (Sharpe-Timms *et al*, 1998).

Os genes da família HOX são genes relacionados à produção de fatores reguladores importantes na embriogênese humana. Atuam no desenvolvimento embrionário, no desenvolvimento dos ductos de Müller, e continuam a ser expressos pelo útero adulto. Taylor descreveu os papéis dos genes HOXA 10 e HOXA 11 na regulação do crescimento endometrial durante o ciclo menstrual. Este autor mostrou a importância destes genes na implantação embrionária em camundongos e parecem ter papel similar em humanos. Ao avaliar os níveis de HOXA 10 e HOXA11 nas mulheres com endometriose, Taylor demonstrou que a expressão destes genes não atingia os valores esperados na fase lútea média, quando comparados com controles. A expressão aberrante destes genes pode explicar a gênese da infertilidade a nível endometrial neste grupo de mulheres (Taylor *et al*, 2000; Taylor *et al*, 1997; Taylor *et al*, 1999).

São inúmeros os fatores que, presentes em determinadas mulheres susceptíveis, podem levar ao desenvolvimento da endometriose. Este é um vasto campo de pesquisa que há muitas décadas vem sendo explorado, mas ainda há muita controvérsia em relação à determinação de quais fatores seriam realmente importantes na endometriose. Ainda não conhecemos com clareza o comportamento da proliferação celular e da apoptose na endometriose, sendo necessário novos estudos. Este entendimento abrirá caminho para o desenvolvimento de drogas mais eficazes, melhorando assim o prognóstico clínico e reprodutivo destas mulheres acometidas.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

2.1 - Objetivos gerais:

Comparar proliferação e apoptose celular de células glandulares e estromais do endométrio tópico e ectópico de pacientes com endometriose, correlacionando os achados com as localizações das lesões endometrióticas.

2.2 - Objetivos específicos:

Avaliar em células glandulares e estromais de tecido endometrial tópico e ectópico de mulheres com endometriose:

- a) índice de proliferação celular através da técnica do PCNA (*proliferative cell nuclear antigen*);
- b) apoptose através da marcação do anticorpo *fas*;
- c) relacionar os achados histológicos com a localização da lesão (peritoneal, ovariana e septo reto-vaginal) e comparar os resultados com os obtidos de amostras teciduais de endométrio tópico destas mesmas pacientes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material

Foram avaliadas amostras teciduais de endométrio tópico e ectópico de mulheres no mecnome, apresentando ciclos menstruais regulares, com idade entre 18 e 40 anos, submetidas à laparoscopia por dor pélvica crônica e/ou infertilidade conjugal em Hospital Universitário Terciário. As amostras foram colhidas por biópsias de diferentes lesões endometrióticas para estudo histopatológico e imuno-histoquímico através de instrumental laparoscópico e biópsia de endométrio tópico através de cureta de Novak. Nenhuma das mulheres havia usado contraceptivos hormonais orais ou injetáveis nos últimos 3 meses, ou acetato de medroxiprogesterona de depósito nos últimos 9 meses ou análogos do GnRH nos últimos 6 meses.

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, sob número 3318/2004. Todas as pacientes foram informadas sobre o estudo e aquelas que concordaram em participar assinaram Termo de Consentimento Informado.

Foram incluídas 29 pacientes com amostras de endométrio tópico e ectópico (8 pacientes com lesão peritoneal, 14 com endometrioma ovariano e 7 com lesão infiltrativa profunda, todas de localização no septo reto-vaginal). O material foi imerso em gel de crioprotetor e mantido congelado em criotubos, após imersão em nitrogênio líquido e armazenamento posterior em Freezer à temperatura de -70°C . Após o processamento do material, foram excluídas amostras devido a baixa marcação imunohistoquímica (4 pacientes com endometrioma ovariano, 2 pacientes com lesão peritoneal e 3 pacientes com lesão de septo reto-vaginal). Portanto, foram analisadas neste estudo um total de 22 amostras (10 endometriomas, 6 lesões peritoneais e 6 lesões de septo reto-vaginal).

3.2 - Método imunohistoquímico

3.2.1 - Marcadores Imunohistoquímicos:

PCNA: - *Proliferating Cell Nuclear Antigen* – (Novocastra Laboratório Ltda – clone PC 10) - anticorpo monoclonal de camundongo; imunoglobulina da classe IgG2a. Este antígeno funciona como um co-fator da DNA polimerase na fase S do ciclo celular e também está associado com mecanismos de reparos do DNA. As células em proliferação celular ficam então marcadas pelo PCNA. Utilizamos diluição 1:200 e consideramos a marcação nuclear.

fas: (Novocastra Laboratório Ltda – clone GM 30) - anticorpo monoclonal de camundongo; imunoglobulina da classe IgG1. Também conhecido como antígeno CD 95, é uma glicoproteína transmembrana que media a apoptose através de ligação com receptor próprio. Utilizamos diluição 1:100 e consideramos a marcação citoplasmática.

3.2.2 - Técnica de Imunohistoquímica:

As reações de imunohistoquímica foram realizadas em cortes histológicos de 4-5 μ através de reação antígeno-anticorpo seguida de revelação da reação com marcador visível ao microscópio. As lâminas desparafinadas e hidratadas foram recuperadas antigenicamente através de incubação em panela a vapor em meio tamponado por 40 minutos. Após resfriamento do material, as peroxidases teciduais endógenas foram removidas pela adição de peróxido de hidrogênio e ligações inespecíficas do anticorpo primário foram evitadas por adição de soro de cavalo. As lâminas foram então

incubadas com anticorpo primário por 12 horas em câmara úmida. Em seguida, houve a incubação com anticorpo secundário e, por último, a etapa avidina-biotina. A reação foi identificada após a revelação por tratamento com DAB (Sigma-Aldrich Inc., USA) por cinco minutos e contra coloração com Hematoxilina de Harris seguida de montagem das lâminas.

3.3 - Critérios de avaliação imunohistoquímica

Na avaliação do PCNA, utilizamos método quantitativo, com contagem de células marcadas pela imunohistoquímica em 1000 células contadas na lâmina, contando-se células nos quatro quadrantes de cada lâmina. Com base neste cálculo, obtivemos o **Índice de Proliferação Celular (IPC)**: número de células marcadas para o PCNA em 1000 células contadas, tanto células glandulares quanto estromais, que foram analisadas separadamente.

A marcação com *fas* foi feita por análise semi-quantitativa, com marcação em cruzes, a saber: 0 = ausência de células marcadas na lâmina; +/4 = até 25% de células marcadas; ++/4 = entre 25% a 50% de células marcadas; +++/4 = entre 50% e 75% de células marcadas; ++++ /4 = >75% de células marcadas.

Todas as lâminas foram analisadas por dois patologistas com experiência em imunohistoquímica, sem identificação do tipo de tecido analisado. A análise da glândula e do estroma foi realizada na mesma lâmina.

3.4 - Análise estatística

Todos os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da média para o IPC e em porcentagem para a avaliação da apoptose. Foi utilizado o programa de análise estatística GraphPad Prisma 3.0. Os dados com distribuição normal foram estatisticamente analisados utilizando o teste *t student* e, para variáveis não-paramétricas, o teste de Mann-Whitney. Para a avaliação dos resultados de apoptose, utilizamos o teste de Qui-quadrado. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando o $p < 0,05$.

4.RESULTADOS

4.1 Avaliação do Índice de Proliferação Celular (IPC)

4.1.1 – *Tecido Glandular*

Observou-se maior proliferação celular no endométrio ectópico do que no endométrio típico (IPC $0,12 \pm 0,04$ e $0,18 \pm 0,06$, respectivamente, $p = 0,034$), considerando todas as amostras juntas (Figura 4). Quando avaliados separadamente, não houve diferença entre o IPC dos três tecidos endometriais ectópicos comparados aos seus respectivos endométrios típicos (Tabela 1). Observou-se maior IPC na lesão peritoneal quando comparada com a lesão de septo reto-vaginal ($p = 0,009$). Não houve diferença entre o IPC de lesões peritoneais e endometrioma ou entre endometrioma e lesões de septo reto-vaginal. Os endométrios típicos correspondentes às diversas lesões não apresentaram diferenças entre si (Tabela.1).

4.1.2 – *Tecido Estromal*

Observou-se que o estroma do tecido típico apresenta maior proliferação celular que o estroma das lesões endometrióticas (IPC $0,05 \pm 0,01$ e $0,02 \pm 0,01$, respectivamente, $p: 0,016$). Quando avaliados separadamente, não houve diferença entre o IPC estromal dos 3 tecidos endometriais ectópicos comparados aos seus respectivos endométrios típicos. Observou-se um maior IPC no endométrio típico correspondente à lesão peritoneal quando comparado ao endométrio típico correspondente à lesão ovariana (Tabela 2).

Tabela 1 – Resultado do IPC nos diferentes tipos de lesão endometriótica quando comparados com seus respectivos endométrios tópicos – GLÂNDULA.

<i>Lesão</i>	<i>N</i>	<i>Endométrio ectópico</i>	<i>Endométrio tópico</i>
<i>Endometrioma</i>	10	0,34 ± 0,13	0,08 ± 0,03
<i>Septo reto-vaginal</i>	6	0,01 ± 0,01*	0,15 ± 0,13
<i>Peritônio</i>	6	0,14 ± 0,07*	0,15 ± 0,09

* $p = 0,009$

Tabela 2 - Resultado do IPC nos diferentes tipos de lesão endometriótica quando comparados com seus respectivos endométrios tópicos - ESTROMA.

<i>Lesão</i>	<i>N</i>	<i>Endométrio ectópico</i>	<i>Endométrio tópico</i>
<i>Endometrioma</i>	10	0,014 ± 0,01	0,04 ± 0,01*
<i>Septo reto-vaginal</i>	6	0,014 ± 0,01	0,06 ± 0,02
<i>Peritônio</i>	6	0,05 ± 0,02	0,09 ± 0,02*

* $p=0,04$

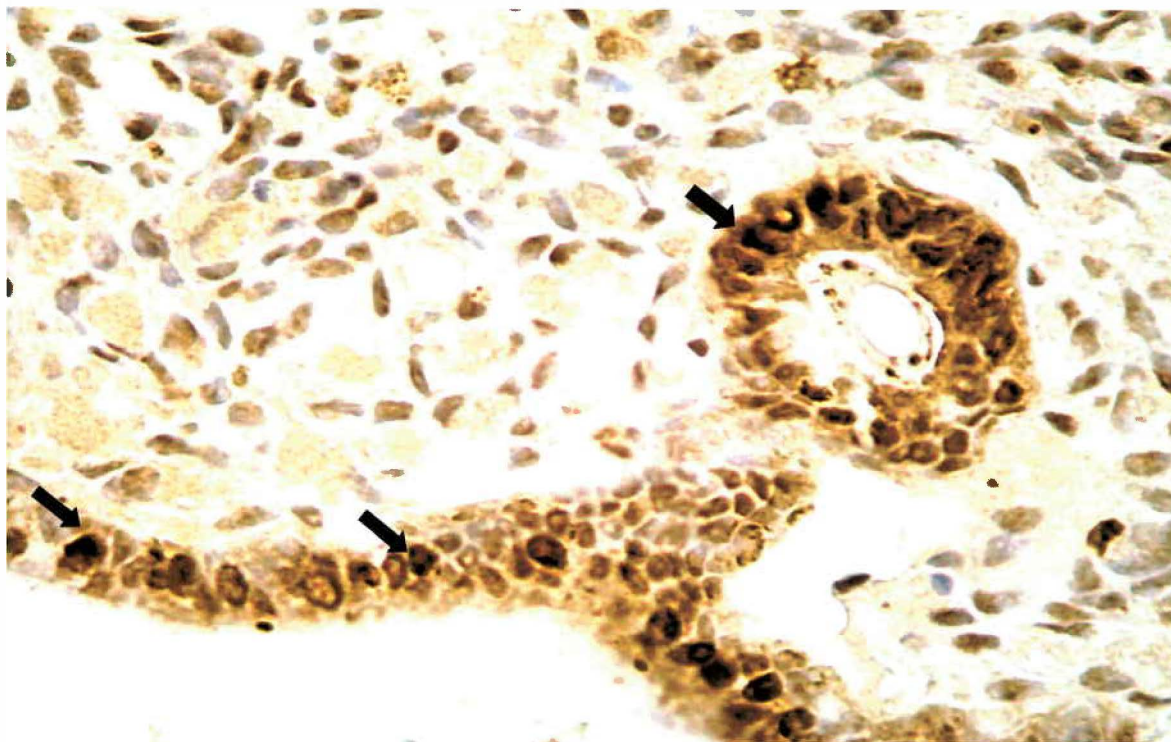


Figura 4: Marcação com PCNA em tecido glandular (setas) - aumento de 400 x.

4.2 Avaliação do Índice Apoptótico (IA)

4.2.1 – *Tecido Glandular*

Ao avaliarmos todas as lesões endometrióticas, observou-se que das 22 lâminas de lesões, 16 não apresentaram marcação imunohistoquímica para *fas* (72,7%). Dentre as seis lâminas marcadas (27,3%), todas elas apresentaram marcação fraca de 1+/4 (Fig.2). Na avaliação do endométrio tópico, encontrou-se resultado semelhante: 15 lâminas não marcaram para *fas* (68,1%); entre as 7 lâminas (31,9%) que foram marcadas, todas apresentaram marcação fraca de 1+/4. Não houve diferença quando comparou-se o endométrio ectópico com o tópico ($p= 1,00$)

Dentre as lesões peritoneais, 2/6 apresentaram marcação fraca de 1+/4 pelo *fas* (33,3%) e no endométrio tópico correspondente, 3/6 apresentaram marcação 1+/4 (50%, $p=1,00$)

No endometrioma ovariano, 8 entre 10 lesões não apresentaram qualquer marcação (80%). As duas lesões marcadas (20%) apresentaram marcação 1+/4. O endométrio tópico correspondente a essas lesões apresentou o mesmo comportamento: 8 lesões não marcadas (80%) e 2 lesões (20%) com marcação de 1+/4 ($p= 1,42$)

Nas lesões de septo reto-vaginal, 2/6 lesões (33,3%) apresentaram marcação de 1+/4 e no endométrio tópico correspondente houve resultados semelhantes (2/6 lesões marcadas $p=1,45$).

Não houve diferença na marcação pelo *fas* entre as diversas localizações de tecido ectópico (marcação fraca em 2/10 endometriomas, 2/6 lesões de septo reto-vaginal, 2/6 lesões peritoneais, $p=0,60$).

Os resultados estão representados na tabela 3.

4.2.2 - Tecido Estromal

Ao avaliarmos todas as lesões endometrióticas, observou-se marcação com o *fas* em 5/22 lesões endometrióticas (22,7%), sendo que 4 apresentavam marcação 1+/4 e 1 lesão apresentou marcação 2+/4. No endométrio tópico, 10/22 apresentaram marcação pelo *fas* (45,4%), sendo que 6 apresentavam marcação 1+/4, 2 apresentavam 2+/4 e 2 3+/4. Não encontramos diferenças significantes entre a apoptose no estroma do endométrio tópico e ectópico ($p= 0,31$)

Ao avaliar separadamente cada localização, observou-se que nas lesões peritoneais, 2/6 lesões apresentaram marcação (33,3%), sendo 1 lesão 1+/4 e 1 lesão

2+/4. Em relação ao endométrio tópico correspondente, todas as 6 lâminas foram marcadas, sendo que 3 apresentaram marcação de 1+/4 (50%), 2 apresentaram marcação 2+/4 (33,3%) e 1 apresentou marcação 3+/4 (16,6%), sem significância estatística entre a marcação de apoptose na lesão peritoneal e no seu endométrio tópico ($p= 0,09$)

Entre as lesões de endometrioma ovariano, 1/9 apresentou marcação (10%) apresentou fraca marcação (1+/4) e no endométrio tópico correspondente, 4/10 lâminas marcaram para *fas*, sendo 3 com marcação fraca (1+/4 – 75%) e 1 marcação 3+/4 (25%), sem significância estatística ($p= 0,28$).

Entre as 6 lesões de septo reto-vaginal, 2/6 apresentavam marcação (33,3%), todas elas fracas (1+/4). No endométrio tópico correspondente, em nenhuma das 6 lâminas obtivemos marcação pelo *fas*, sem significância estatística ($p= 0,12$).

Quando comparados os diversos tipos de lesão entre si, não observou-se diferenças entre a lesão peritoneal x ovariana ($p= 0,36$); peritoneal x septo-reto vaginal ($p=0,51$) ou entre ovariana x septo reto-vaginal ($p= 0,52$) para a marcação pelo *fas*.

Os resultados estão representados na tabela 4.

Tabela 3 – Resultado do IA nos diferentes tipos de lesão endometriótica quando comparados com seus respectivos endométrios tópicos – GLÂNDULA.

Tipo de lesão	IA – endométrio tópico				IA – endométrio ectópico				p
	0+/4	1+/4	2+/4	3+/4	0+/4	1+/4	2+/4	3+/4	
<i>Peritoneal</i>	0	3	2	1	4	1	1	0	1,0
<i>Ovariana</i>	6	3	0	1	9	1	0	0	1,42
<i>Septo reto-vaginal</i>	6	0	0	0	4	2	0	0	1,45
Total	12	6	2	2	17	4	1	0	1,0

Tabela 4 – Resultado do IA nos diferentes tipos de lesão endometriótica quando comparados com seus respectivos endométrios tópicos – ESTROMA.

Tipo de lesão	IA – endométrio tópico				IA – endométrio ectópico				p
	0+/4	1+/4	2+/4	3+/4	0+/4	1+/4	2+/4	3+/4	
<i>Peritoneal</i>	3	3	0	0	4	2	0	0	0,09
<i>Ovariana</i>	8	2	0	0	8	2	0	0	0,28
<i>Septo reto-vaginal</i>	4	2	0	0	4	2	0	0	0,12
Total	15	7	0	0	16	6	0	0	0,31

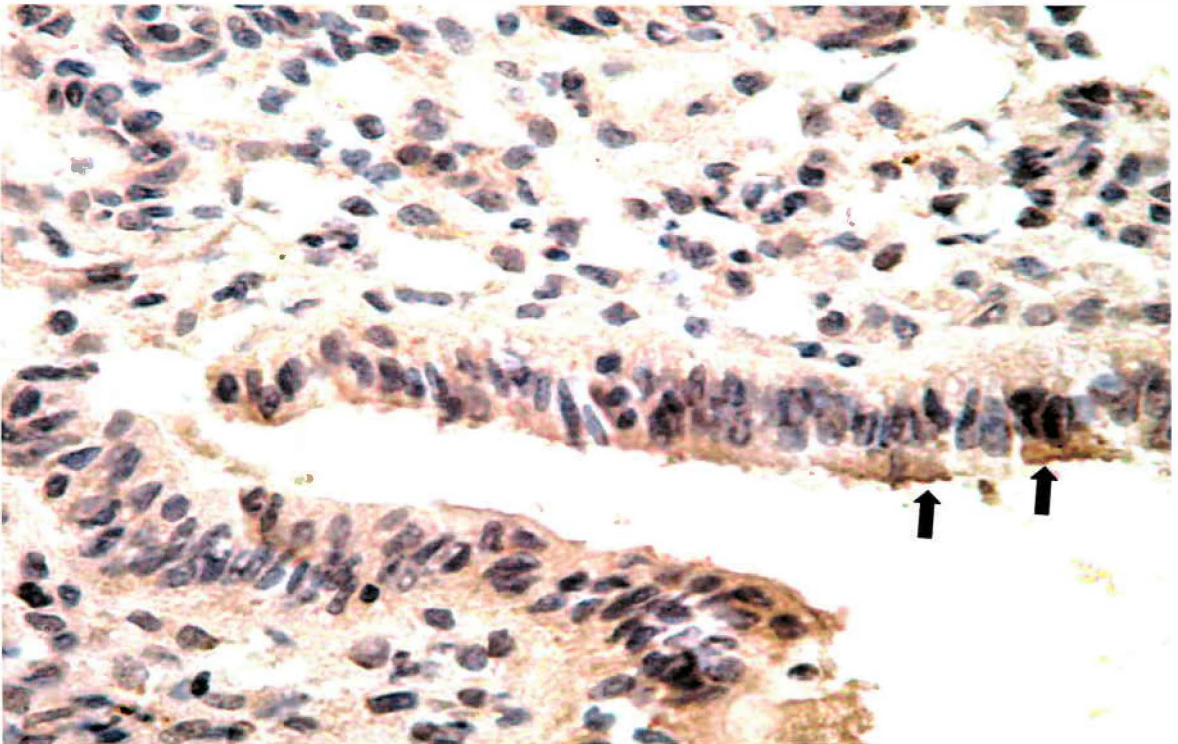


Figura 5: Marcação pelo *fas* em glândula (setas) – aumento de 400 x.

5. DISCUSSÃO

Alterações intrínsecas de controle de proliferação celular e apoptose vêm sendo exaustivamente estudadas na endometriose. À luz dos estudos atuais já podemos afirmar com segurança que o endométrio tópico destas pacientes apresenta uma série de alterações nos mecanismos de controle de proliferação celular e apoptose, dentre outros, que permitem que este tecido tenha maior viabilidade na cavidade pélvica e, portanto, maior capacidade de sobrevivência, implantação e proliferação, dando origem aos focos de endometriose. (Wingfield *et al*;1994; S S Seo *et al*, 2000; Jonhson *et al*, 2005; Nalbanski *et al*, 2004).

Nas mulheres com endometriose, além das alterações próprias do endométrio, possivelmente alterações do microambiente e da superfície de aderência peritoneal contribuem também para tornar este tecido refluído ainda mais favorável à implantação e sobrevivência na cavidade pélvica. Ao compararmos as lesões endometriais com seus respectivos endométrios tópicos, estudamos indiretamente os efeitos que os componentes deste microambiente peritoneal possam exercer sobre este tecido refluído.

Proliferação Celular

Inúmeros trabalhos tentam definir o comportamento tanto do endométrio normal quanto do endométrio de mulheres com endometriose em relação ao padrão de proliferação, porém ainda há resultados controversos.

No endométrio de mulheres normais, a proliferação do tecido glandular da camada funcional do endométrio tem um padrão cíclico, com proliferação máxima na fase proliferativa tardia, com decréscimo importante ao longo da fase secretora, até praticamente ausente na fase menstrual. O tecido estromal, ao contrário, apresenta dois picos de proliferação celular, um na fase proliferativa e outro na fase pré-menstrual.

Este mesmo padrão é mantido em mulheres com endometriose, tanto no tecido glandular quanto estromal (Shuang-fang Li *et al*, 1993; Wingfield *et al*, 1995; Jurgensen *et al*, 1996; Nisolle e Donnez, 1997; Beliard *et al*, 2004).

Em relação ao comportamento do endométrio tópico de mulheres com endometriose, alguns estudos mostram maiores IPC quando comparados a controles, mas somente na fase proliferativa do ciclo menstrual, tanto no tecido glandular quanto estromal (Wingfield *et al*, 1995; Shuang-fang Li *et al*, 1993; Johnson *et al*, 2005), porém outros trabalhos não encontraram diferenças significantes (Jurgensen *et al*, 1996; Scotti *et al*, 2000; Beliard *et al*, 2004).

No nosso trabalho, encontramos, no tecido glandular, um maior IPC no tecido endometrial ectópico quando comparado com o tecido tópico. Vários estudos anteriores corroboram os nossos achados. Um dos estudos pioneiros foi o de Shuan-fang Li *et al*, 1993, que encontrou maior IPC através de PCNA nas lesões endometrióticas, ao longo de todo ciclo menstrual. Assim como no nosso estudo, este comportamento restringiu-se ao tecido glandular.

Ao contrário, outros estudos não mostram diferenças entre os endométrios tópicos e ectópicos, ou mesmo mostram menor proliferação no tecido ectópico, tanto no tecido glandular quanto no estroma. Essas diferenças entre os estudos provavelmente devem-se às diferentes metodologias empregadas e aos tipos diferentes de lesões endometrióticas estudadas. Outra característica relatada na literatura é a perda de variação ao longo do ciclo menstrual no tecido ectópico (Jones *et al*, 1995; Nisolle *et al*, 1997; Scotti *et al*, 2000; Beliard *et al*, 2004;).

Poucos estudos avaliam e comparam separadamente os diferentes tipos de lesão, e não encontramos na literatura nenhum que avalie PCNA nas lesões peritoneais, ovariana e de septo reto-vaginal. Nisolle e Donnez, primeiros autores a postularem a

hipótese de que os diferentes tipos de lesão são entidades diferentes, estudaram, em 1997, o IPC através do Ki67 comparando lesões peritoneais negras, vermelhas e endometriomas ovarianos, juntamente com o endométrio tópico. No tecido glandular, na fase proliferativa, dentre as 3 lesões, a que apresentou maior IPC foi a lesão peritoneal vermelha, entretanto, comparada com o endométrio tópico, apresentou um menor IPC estatisticamente significativo. Fujishita *et al*, 1999, também encontrou maior marcação de PCNA nas lesões vermelhas quando comparadas com as lesões negras e brancas. Assim também, encontramos maior IPC na lesão peritoneal quando comparada a de septo reto-vaginal, mas não encontramos diferença com seu respectivo endométrio tópico. Apesar de numericamente a lesão ovariana apresentar maiores IPC no nosso trabalho, não encontramos diferenças estatísticas entre esta lesão e as demais. Isso provavelmente deveu-se a grande variação do IPC neste grupo. No estudo de Nisolle, também não houve diferença entre a lesão ovariana e as lesões peritoneais.

Um dado interessante destes autores foi a presença de proliferação celular na fase secreta do ciclo no tecido ectópico, enquanto ausente no endométrio tópico.

A presença do estroma parece ser papel preponderante no desenvolvimento da endometriose. Vários autores definem histologicamente endometriose somente se o estroma estiver presente. Quando avaliamos o estroma, encontramos maiores IPC no endométrio tópico em relação às lesões. Estes resultados também são corroborados com os de Nisolle e Donnez *et al*, 1997, que encontraram resultados significantes na fase proliferativa do ciclo, com menor IPC nas lesões peritoneais e ovariana em relação ao endométrio tópico.

No nosso estudo, a lesão que apresentou maior IPC do estroma foi a lesão peritoneal, embora sem resultados estatisticamente significante. Os próprios Nisolle e Donnez, em estudos anteriores, encontraram uma maior vascularização do estroma destas lesões peritoneais, em especial as lesões vermelhas, consideradas as lesões mais

ativas. Quando avaliamos os endométrios correspondentes às lesões de endometriose, encontramos maior atividade proliferativa no endométrio da lesão peritoneal quando comparado ao endométrio da lesão ovariana. Não encontramos na literatura dados a respeito de diferenças entre os endométrios tópicos correspondentes às várias lesões endometrióticas, mas alterações na estrutura deste endométrio poderiam ser responsáveis pela definição da localização da lesão. De acordo com nossos resultados, alterações estromais intrínsecas do endométrio podem ser implicadas na etiopatogenia deste tipo específico de lesão.

Nossos resultados mostram ainda um baixo IPC nas lesões de septo reto-vaginal. Estudos avaliando o comportamento histológico destas lesões mostraram diferenças importantes, com mínimo componente estromal e grande componente de células musculares. O comportamento clínico mais agressivo deste tipo de lesão possivelmente não se correlaciona com maior atividade proliferativa (Nisolle e Donnez *et al*, 1997).

Apoptose

Várias alterações tanto qualitativas quanto quantitativas na expressão de proteínas relacionadas com apoptose vêm sendo exaustivamente estudadas, tanto no endométrio tópico de mulheres com e sem endometriose, quanto no tecido endometrial ectópico.

Durante o ciclo menstrual, ocorre uma série de alterações nos mecanismos de controle celular, com maiores índices de apoptose na fase secretora e menstrual. Isto foi demonstrado por diversos autores (Dmowski *et al*, 2001; Watanabe *et al*, 1997; Beliard *et al*, 2004; Jonhson *et al*, 2005), utilizando várias metodologias (técnica do TUNEL, proteínas pró-apoptóticas como p53, p21, BAX e *Fas*; e proteínas anti-apoptose, como o BCL-2 e BCL-X).

Resultados são controversos em relação ao comportamento da apoptose no endométrio tópico das mulheres com endometriose. Vários autores encontraram menores índices de apoptose neste grupo de pacientes, utilizando também várias metodologias (Meresman *et al*, 2000; Braus *et al*, 2002; Gebel *et al* 1998; Jonhson *et al*, 2005; Symanowski *et al*, 2006), porém outros autores não confirmam estes resultados (Beliard *et al*, 2004; Jones *et al*, 1998). Possivelmente estas variações nos resultados devam-se a diferenças na metodologia utilizada.

No tecido endometrial ectópico, também encontramos resultados controversos. Jones *et al*, 1998, Dmowski *et al*.2001 e Beliard *et al*, 2004, encontraram menos apoptose nas lesões quando comparados ao endométrio tópico. Consistentemente os trabalhos também mostram perda da variabilidade cíclica da apoptose nestas lesões. Nishida *et al*, 2005, não encontrou diferenças entre os tecidos endometriais tópicos de mulheres com e sem endometriose e nas lesões endometrióticas quando estudou *fas* e *fas-L*, mas encontrou maior marcação por BCL-2 e BCL-X no tecido endometrial ectópico. Variações nos diversos tipos de lesão também vêm sendo estudadas. De acordo com alguns autores, a expressão de BCL-2 é menor nas lesões císticas em relação às lesões peritoneais (Haranda *et al*, 1996; Nezhat *et al*, 2002).

Poucos trabalhos avaliam o padrão de marcação do *fas* nas lesões endometrióticas. Harada *et al*, 1996, não encontrou diferença entre o tecido tópico e ectópico quando analisou a marcação do *fas*. Watanabe *et al*, 1997, observou marcação pelo *fas* somente nas células glandulares e não nas estromais, e perda da variação cíclica ao longo das fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual, tanto no tecido tópico quanto ectópico. Não houve diferença na marcação do *fas* entre o tecido tópico e ectópico.

Dufournet *et al*, 2005, estudaram vários marcadores imunohistoquímicos para apoptose (p53, p21, BAX, BCL-2 e *fas*) no endométrio tópico e nos três tipos de lesão

endometriótica (peritoneal, ovariana e de septo reto-vaginal). Na análise qualitativa, estes autores encontraram diferenças entre as lesões somente nos marcadores BCL-2 e *fas*. A lesão peritoneal diferiu das demais com maior marcação pelo BCL-2 e pelo *fas*. Na avaliação semi-quantitativa, a expressão do BCL-2 foi menor na lesão ovariana quando comparada com as demais, resultados compatíveis com relatos prévios (Suganuma *et al*, 1997; Mc Laren *et al*, 1997, Nezhat *et al*, 2002). Este autor também encontrou altos índices de BCL-2 na lesão colon-retal, sugerindo uma menor sensibilidade deste tecido a apoptose. Esta diferença no padrão de apoptose pode ser explicada pela teoria de Nisolle e Donnez, que defendem etiopatogenias distintas para estes dois tipos de lesão. Neste trabalho ainda, os autores encontraram menor expressão do *fas* na lesão ovariana e colon-retal quando comparada com a lesão peritoneal. Estes resultados sugerem que cada tipo de lesão pode utilizar diferentes mecanismos de apoptose.

Nos estudos de Beliard *et al*, 2004, a lesão peritoneal expressou maior quantidade de BCL-2, quando comparada com endométrio típico de mulheres com e sem endometriose.

Vários trabalhos existem avaliando marcadores de apoptose na endometriose, mas em relação ao marcador *fas* isto ainda não é verdade, principalmente quando o objetivo é avaliar os diferentes tipos de lesão, justificando a necessidade de novos trabalhos nesta área. Em nossa casuística, não encontramos diferenças estatísticas entre o padrão de marcação com *fas* quando comparamos as lesões com os endométrios típicos ou mesmo quando comparamos os diversos tipos de lesões. Nossos resultados apontam para outras vias relacionadas a apoptose, que não a via do *fas/fasL*, na gênese da endometriose e na diferenciação dos diversos tipos de lesões.

6. CONCLUSÕES

1. O IPC é maior no tecido glandular endometrial ectópico.
2. A glândula da lesão peritoneal apresenta maior IPC que a glândula da lesão de septo reto-vaginal
3. O estroma do endométrio tópico apresenta-se mais proliferado que o estroma das lesões endometriais.
4. O estroma do endométrio tópico da lesão peritoneal é mais proliferado que o estroma do endométrio tópico do endometrioma.
5. O padrão de apoptose não difere entre as lesões endometriais e entre os respectivos endométrios tópicos.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1) Abrão MS, Podgaec S, Filho BM, Ramos LO, Pinotti JA, de Oliveira RM. The use of biochemical markers in the diagnosis of pelvic endometriosis. *Hum Reprod* 1997; 12(11): 2523-2527.
- 2) Abrão MS, Ikeda F. O impacto da laparoscopia no diagnóstico da endometriose. In: Abrão MS (Eds). *Endometriose: uma visão contemporânea*. Livraria e Editora Revinter Ltda. 2000; cap 9.
- 3) Ailawadi RK, Jobanputra S, Kataria M, Gutares B, Bulun SE. Treatment of endometriosis and chronic pelvic pain with letrozole and norethindrone acetate: a pilot study. *Fertil Steril* 2004; 8: 290-6.
- 4) Amsterdam LL, Gentry W, Jobanputra S, Wolf M, Rubin SD, Bulun SE. Anastrozole and oral contraceptives: a novel treatment for endometriosis. *Fertil Steril*. 2005; 84 (2):300-4.
- 5) Andersson S, Moghrabi N. Physiology and molecular genetics of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Steroids*. 1997; 62 (1):143-7.
- 6) Arici A, Tazuke SI, Attar E, Kliman HJ, Olive DL. Interleukin-8 concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis and modulation of interleukin-8 expression in human mesothelial cells. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 40-5.
- 7) Arici A, Seli E, Zeyneloglu HB et al. Interleukin-8 induces proliferation of endometrial stromal cells: a potential autocrine growth factor. *J Clin Endocrinol Metabol* 1998; 83: 1201-1205.
- 8) Attar E, Bulun SE. Aromatase inhibitors: the next generation of therapeutics for endometriosis? *Fertil Steril* 2006; 85(5):1307-18.
- 9) Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85(8):2897-902.

- 10) Barbieri RL. CA-125 in patients with endometriosis (Editorial). *Fertil. Steril* 1986; 45:767-769.
- 11) Bast RC Jr; Klug TL; Jonh E; Jenison E; Niloff JM; Lazarus H; Berkowitz RS; Leavitt T, Griffiths CT; Parker L; Zurawski VR Jr; Knapp RC. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl Med* 1983; 309: 883-887.
- 12) Beliard A, Donnez J, Nisolle M, Foidart JM. Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis. *Fertil Steril* 1997; 67: 266-72.
- 13) Beliard A, Noel A, Joidart JM. Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertil Steril* 2004; 8: 80-85
- 14) Brandenburg AW, Lebovic DI, Tee MK et al. Oestrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta isoforms in normal endometrial and endometriosis- derived stromal cells. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 651-5.
- 15) Braun DP; Ding J; Shen J; Rana N; Fernandez BB; Dmowski WP. Relationship between apoptosis and the number of macrophages in eutopic endometrium from women with and without endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 78(4): 830-835.
- 16) Bulun SE, Mahendroo MS & Simpson ER. Polymerase Chain Reaction Amplification Fails to Detect Aromatase Cytocrome P450 Transcripts in Normal Human Endometrium or Decidua. *J Endocrinol Metabol* 1995; 76: 1458-63.
- 17) Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K et al. Aromatase expression in endometriosis: biology and clinical perspectives. In: Lemay A, Maheux R, eds. *Understanding and managing endometriosis. Advances in research and practice.* Quebec City: Parthenon Publishing; 1998: 139-48.

- 18) Bulun SE, Gurates B, Fang Z et al. Mechanisms of Excessive Estrogen Formation in Endometriosis . *J Reprod Immunol* 2002; 55: 21–33.
- 19) Buriev VA, Pavilovich SV, Il'yasova NA. Apoptosis and proliferative activity in endometrium during peritoneal endometriosis. *Bull Exp Biol Med* 2006; 141(2); 204-7.
- 20) Chinnaiyan A.M, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995; 81:505-512.
- 21) Clark AH. Endometriosis in a young girl. *JAMA* 1948; 136: 690.
- 22) Cornillie, F.J.; Oosterlynck, D.; Lauweryns, J.M.; Koninckx, P.R. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril.* 1990; 53: 978-983.
- 23) Cullinan-Bove K, Koos RD. Vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology* 1993; 133; 829-37.
- 24) Dabrosin C; Gyorffy S; Margetts P; Ross C; Gauldie J. Therapeutic effect of angiostatin gene in a murine model endometriosis. *Am J Pathol* 2002;161(3): 909-918.
- 25) Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* 1998; 17: 2215-2223.

- 26) Dmowski WP; Ding J; Shen J; Rana N; Hernandez BB; Braun DP. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with or without endometriosis. *Hum Reprod* 2001; 16(9): 1802-1808.
- 27) Donnez J, Nisolle M, Gillet N, Smets M, Bassil M, Casanas-Roux F. Large ovarian endometriomas. *Hum Reprod* 1996; 11: 641-646.
- 28) Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod* 1998; 13: 1686-90.
- 29) Dufournet C, Uzan C, Fauvet R, Cortez A, Siffroi JP, Darai E. Expression of apoptosis-related proteins in peritoneal, ovarian and colorectal endometriosis. *J of Reprod Immun* 2005; in press.
- 30) Dunselman GA, Hendrix MG, Bouckaert PX, Evers JL. Functional aspects of peritoneal macrophages in endometriosis of women. *J Reprod Fertile* 1988; 82: 707-10.
- 31) El-Mahgoub S, Yaseen S. A positive proof for the theory of coelomic metaplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137: 137-40.
- 32) Falconnier A & Chapron C. Endometriosis and pelvic pain: epidemiological evidence of the relationship and implications. *Human Reprod Update* 2005; 11(6); 595-606.
- 33) Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ, Puck JM. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995; 81: 935-946.
- 34) Fujishita A; Hauso A; Khan KN; Masuzaki H; Nakashima H; Ishimaru T. Immunohistochemical study of angiogenic factors in endometrium and endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 48 Suppl 1: 36-44.

- 35) Gallová UZ, Bouse V, Svábek L, Turek J et al. Endometriosis in Reproductive Immunology. *Am J Reprod Immunol* 2002; 47: 269-74.
- 36) Garcia-Velasco JA, Arici A. Apoptosis and the pathogenesis of endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003; 21: 165-72
- 37) Garcia-Velasco JA, Arici A, Zreik T, Naftolin F, Mor G. Macrophage derived growth factors modulate Fas ligand expression in cultured endometrial stromal cells: A role in endometriosis. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 642-50.
- 38) Gazvani MR, Christmas S, Quenby S, Kirwan J, Johnson PM, Kingsland CR. Peritoneal fluid concentrations of interleukin-8 in women with endometriosis: relationship to the stage of disease. *Human Reprod* 1998; 13: 1957-61.
- 39) Gebel HM, Braun DP, Tabmbur DP, Frame D, Rana N, Dmowski WP. Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1998; 69: 1042-7.
- 40) Grosskinsky CM, Yowell CW, Sun J, Parise LV et al. Modulation of integrin expression in endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2047- 54.
- 41) Halme J, Becher S, Hammond MG, Raj MHG et al. Increased activation of pelvic macrophages in infertile women with mild endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 145: 333.
- 42) Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 151-154.
- 43) Haranda M, Suganuma N, Furuhashi M, Nagasaka T, Nakashima N, Kikkawa F, Tomoda Y, Furui K. Detection of apoptosis in human endometriotic tissues. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 307-315.

- 44) Hobbs JE, Bortrack AR. Endometriosis in the lung: experimental and clinical study. *Am J Obstet Gynecol*, 1940; 40: 832-3.
- 45) Hughesdon PE. The structure of endometrial cysts of the ovary. *J Obstet Gynecol Brit Emp* 1957; 44: 69-84.
- 46) Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997; 388:190-195.
- 47) Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Tanikawa M, Onohara Y, Terakawa N. Pathogenetic significance of levels of interleukin-8 in peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Fertil Steril* 1998; 69: 924-9.
- 48) Jacob I, et al. The CA 125 tumour-associated antigen: a review of literature. *Hum Reprod* 1989; 4(1): 1-12.
- 49) Janicki TI; David LJ; Skaf R. Massive and acute hemoperitoneum due to rupture of the uterine artery by erosion from an endometriotic lesion. *Fertil Steril*. 2002; 78(4): 879-881.
- 50) Javert CT. The spread of benign and malignant endometrium in the lymphatic system with a note of coexisting vascular involvement. *Am J Obstet Gynecol* 1952; 64: 780-806.
- 51) Johnson MC, Torres M, Alves A, Bacaliao K, Fuentes A, Vega M, Boric MA. Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: expression of c-myc, TGF-beta 1, and bax genes. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 8: 3-45
- 52) Jones RK, Bulmer JN, Searle RF. Immunohistochemical characterization of proliferation, oestrogen receptor and progesterone receptor expression in

- endometriosis: comparison of eutopic and ectopic endometrium with normal cycling endometrium. *Human Reprod* 1995; 10(12): 3272-9.
- 53) Jones RK, Searle RF, Bulmer JN. Apoptosis and BCL-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod* 1998; 13: 3496-502
- 54) Jurgensen A, Mettler L, Volkov NI, Parwaresch R. Proliferative activity of the endometrium throughout the menstrual cycle in infertile women with and without endometriosis. *Fertil Steril* 1996; 66(3): 369-75.
- 55) Koks CA, Groothuis PG, Dunselman GA et al. Adhesion of menstrual endometrium to extracellular matrix: the possible role of integrin alpha (6) beta (1) and laminin interaction. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 170-7.
- 56) Langendonck AV, Casanas-Roux F & Donnez J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 77 (5): 868-78.
- 57) Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunology of endometriosis. *Fertil Steril* 2001; 75:1-10.
- 58) Lessey BA, Killam AP, Metzger DA, Haney AF, Greene GL, McCarty KS Jr. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metabol* 1988; 67: 334-40.
- 59) Li SF, Nakayama K, Masuzawa H, Fujii S. The number of proliferating cell nuclear antigen positive cells in endometriotic lesions differs from that in the endometrium. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1993; 423: 257-263.
- 60) Magnani JL, Steplewski Z, Koprowski H, Ginsburg V. Identification of gastrointestinal and pancreatic cancer associated antigen detected by monoclonal

- antibody 19-9 in the sera of patients as a mucin. *Cancer Res* 1983; 43: 5489-5492.
- 61) Malik N, Greenfiel BW, Wahl AF, Kiener PA. Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. *J Immunol* 1996; 156: 3952-60.
- 62) Masahashi T; Matsuzawa K; Ohsawa M; Narita O; Asai T; Ishihara M. Serum CA-125 levels in patients with endometriosis: changes in CA-125 levels during menstruation. *Obstet Gynecol* 1988; 72: 328-331.
- 63) Matalliotakis I, Panidis D, Vlassis G, Neonaki M, Goumenou A, Koumantakis E. Unexpected increase of the CA 19-9 tumour marker in patients with endometriosis. *Eur J Gynaecol Oncol* 1998; 19(5): 498-500.
- 64) McBean JH, Brumsted JR. In vitro CA-125 secretion by endometrium from women with advanced endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 59: 89-92.
- 65) McDonnell DP, Dana SL, Hoener PA, Lieberman BA, Imhof MO, Stein RB. Cellular mechanism which distinguish between hormone- and antihormone-activated estrogen receptor. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 761: 121-37.
- 66) McLaren J; Prentice A; Charnock-Jones DS; Sharkey AM; Smith SK. Immunolocalization of the apoptosis regulating proteins BCL-2 and BAX in human endometrium and isolated peritoneal fluid macrophages in endometriosis. *Hum Reprod* 1997; 12: 146-152.
- 67) Medema, JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Schevchenko A, Mann M, Kranmer PH, Peter ME. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* 1997; 16: 2794-2804.

- 68) Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreas-Ortiz O, Tesone M, Rumi LS. Apoptosis and expression of BCL-2 and BAX in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000; 74(4): 760-6
- 69) Mizumoto Y, Hirata J, Tokuoka S, Furuya K, Kikuchi Y, Nagata I. Effect of culture supernatans of endometriotic lesions, uterine endometrium and peritoneum from rats with experimental endometriosis on the natural killer activity of spleen cells. *Gynecol Obstet Invest* 1996; 41: 122-7.
- 70) Moura M.D.; Pereira T.N.; Nogueira A.A.; Ferriani R.A.; Sala M.M.; Reis R.M. Avaliação do Tratamento Clínico da Endometriose. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (RBGO)* 1999. 21 (2):85 – 90.
- 71) Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365.
- 72) Nalbanski A, Karag'ozov, Kiurkchiev D, Kiurcheiv S. Cell proliferation in endometrium of women with endometriosis. *Akush Ginekol* 2004; 43(4): 36-8.
- 73) Nehzat FR, Kalir T. Comparative immunohistochemical studies of endometriosis lesion and endometriotic cysts. *Fertil Steril* 2002, 78: 820-824.
- 74) Niloff JM; Knapp RC; Schaetzel E; Reynolds C; Bast RC Jr. CA-125 antigen levels in obstetric gynecologic patients. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 703-707.
- 75) Nip MM, Miller D, Taylor PV, Gannon MJ, Hancock KW. Expression of heat shock proteins 70KDa in human endometrium of normal and infertile women. *Human Reprod* 1994; 9: 1253-6.
- 76) Nishida M, Nasu K, Ueda T, Fukuda J, Takai N, Miyakawa I. Endometriotic cells are resistant to interferon- γ -induced cell growth inhibition and apoptosis: a possible mechanism involved in pathogenesis of endometriosis. *Mol Human Reprod* 2004; 11(1): 29-34.

- 77) Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, Mine JM, Donnez J. Morphometric study of stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 59: 681-4.
- 78) Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, Mine JM, Donnez J. Peritoneal endometriosis: evaluation of typical and subtle lesions. In Donnez J, Nisolle M, editor. *Laser operative laparoscopy and hysteroscopy*. New York: Pathernon, 1994; 25-39.
- 79) Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* 1997; 68: 585-596
- 80) Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J. Immunohistochemical analysis of proliferative activity and steroid receptor expression in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 1997; 68(5): 912-9.
- 81) Noble LS, Simpson E, Johns A. Aromatase Expression in Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metabol* 1996; 81(1): 174-79
- 82) Nogueira AP; Abrão MS. Endometriose: as hipóteses etiopatogênicas atuais. In: Abrão MS (Eds). *Endometriose: uma visão contemporânea*. Livraria e Editora Revinter Ltda. 2000; cap 2.
- 83) Osteen KG, Yeaman GR, Bruner-Tran KL. Matrix metalloproteinases and endometriosis. *Semin Reprod Med* 2003; 21: 155-64.
- 84) Ota II, Igarashi S, Hatazawa J, Tanaka T. Distribution of heat shock proteins in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis. *Fertil Steril* 1997; 68: 23-8.
- 85) Otsuki Y, Misaki O, Sugimoto O, Ito Y et al. Cyclic BCL-2 gene expression in human endometrium during human menstrual cycle. *Lancet* 1994; 344: 28-29.

- 86) Peter ME, Kischkel FC, Scheuerpflug CG, Medema JP, Debatin KM, Krammer PH. Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signaling complex. *Eur J Immunol* 1997; 27:1207-1212.
- 87) Piotrowski PC, Kwintkiewicz J, Bzeczynska IJ, Seval Y, Cakmak H, Arici A, Duleba AJ. Statins inhibit growth of human endometrialstromal cells independently of cholesterol availability. *Biol Reprod* 2006; 75(1); 107-111.
- 88) Rieux-Laucat F, Blachere S, Danielan S, De Villartay JP, Oleastro M, Solary E, Bader-Meunier B, Arkwright P, Pondare C, Bernaudin F, Chapel H, Nielsen S, Berrah M, Fischer A, Le Deist F. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995; 268:1347-1349.
- 89) Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14: 422-69.
- 90) Sampson JA. Metastatic or embolic endometriosis, due to menstrual dissemination of endometrial tissue into venous circulation. *Am J Pathol* 1927; 3:93.
- 91) Schrodt GR, Alcorn MO, Ibanez J. Endometriosis of the male urinary system: a case report. *J Urol* 1980; 124: 722-3.
- 92) Scott S, Regidor PA, Schindler AE, Winterhager E. Reduced proliferation and cell adhesion in endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 610-7.
- 93) Seibel MM, Zilberstein M. Endometriosis: Mechanisms of infertility. In *DIAMOND & OSTEEEN Endometrium and Endometriosis* 1998; 182-7.

- 94) Selam B, Kayisli UA, Garcia-Velasco JA, Arici A. Extracellular matrix-dependent regulation on Fas ligand expression in human endometrial stromal cells. *Biol Reprod*, 2002; 66:1-5.
- 95) Sharp-Timms KL, Keisler LW, McIntush EW, Keisler DH. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 concentrations are attenuated in peritoneal fluid and sera of women with endometriosis and restored in sera by gonadotropin-releasing hormone agonist therapy. *Fertil Steril* 1998; 69: 1128-34.
- 96) Sharp-Timms KL. Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 943: 131-47.
- 97) Shifren JI, Tseng Jf, Zaloudek Cj, Ryan Jp, Meng Yg, Ferrara N, Jaffe Rb, Taylor Rn. Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice. *J Clin Invest* 1997; 99(12): 2851-2857.
- 98) Shoenbeck U, Mach F, Sukhova GK et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 732: 31-41.
- 99) Somigliana E, Vigano P, Gaffuri B et al. Modulation of NK cell lytic function by endometrial secretory factors: Potential role in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1996; 36: 295-300.
- 100) Soysal S, Soysal ME, Ozer S, Gul N, Gezgin T. The effects of post-surgical administration of goserelin plus anastrozole compared to goserelin alone in patients with severe endometriosis: a prospective randomized trial. *Hum Reprod*. 2004;19(1):160-7.
- 101) Speroff L, Glass RH, Kase NG. Endometriosis. In: Speroff L, Glass RH, Kase NG. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 6. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.

- 102) Sugunuma N, Harada M, Furuhashi M, Nawa A, Kikkawa F. Apoptosis in women endometrial and endometriotic tissues. *Horm Res* 1997; 48: 42-47.
- 103) Surrey SE, Halme J. Endometriosis as a cause of infertility. In Naina Chohan WB. *Endometriosis. Obstet Gynecol Clin North Am* 1989; 16(1): 79-91.
- 104) Szczepanska M, Kozlik J, Skrzypczak J, Mikolajczyk M. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil Steril*. 2003;79(6):1288-93
- 105) Szymanowski K. Apoptosis pattern in human endometrium in women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006 – in press.
- 106) Tabibzadeh S, Kong QF, Satyaswaroop PG, Babaknia A. Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Human Reprod* 1996; 11: 633-40.
- 107) Tatsuya H; Kubota T; Takeshi A. Usefulness of CA 19-9 versus CA-125 for the diagnosis of endometriosis. *Fertil. Steril*. 2002; 78(4): 733-739
- 108) Taylor HS. The role of HOX genes in human implantation. *Human Reprod Update* 2000; 6: 75-9.
- 109) Taylor HS, Vanden Heuvel GB, Igarashi P. A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: Late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod* 1997; 57: 1338-45.
- 110) Taylor HS, Bagot C, Kardana A, Olive D, Arici A. HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis. *Human Reprod* 1999; 14: 1328-31.
- 111) The American Society for Reproductive Medicine- revised American Society for Reproductive Medicine Endometriosis Classification: 1996. *Fertil. Steril* 1997; 67:817-821.

- 112) Toki T, Kubota J, Lu X, Nakayama K. Immunohistochemical analysis of CA125, CA19-9, and Ki-67 in stage III or IV endometriosis: positive correlation between serum CA125 level and endometriotic epithelial cell proliferation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79(9):771-776.
- 113) Tseng JF, Ryan IP, Milan TD et al. Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1118-22.
- 114) Wu MY, Ho HN. The Role of Cytokines in Endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2003; 49: 285-96.
- 115) Vigano P, Gaffuri B, Somigliana E, Busacca M, Di Blasio AM, Vignali M. Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 mRNA and protein in enhanced in endometriosis versus endometrial stromal cells in culture. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 1150-6.
- 116) Zeitoun KM, Bulun SE. Aromatase: a Key Molecule in the Pathophysiology of Endometriosis and a Therapeutic Target. *Fertil Steril* 1999; 72(6): 961-69.
- 117) Zeller LM, Henig I, Radwanska E, Dmowski WP. Enhancement of human monocyte and peritoneal macrophage chemiluminescence activities in women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1987; 13: 78-82.
- 118) Yanagisawa J, Takahashi M, Kanki H, Yano-Yanagisawa H, Tazunoki T, Sawa E, Nishitoba T, Kamishohara M, Kobayashi E, Kataoka S, Sato T. The molecular interaction of Fas and FAP-1. A tripeptide blocker of human Fas interaction with FAP-1 promotes Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272: 8539-8545.
- 119) Watanabe J; Johboh T; Hata H; Kuramoto H. Clinical significance of CA 19-9 for endometriosis. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1990; 42(2): 155-61.

- 120) Watanabe J, Kansaki H, Narukawa S, Inoue T, Katsuragawa H, Kaneko Y, Mori T. Bcl-2 and Fas suppression in eutopic and ectopic human endometrium during the menstrual cycle in relation to endometrial cell apoptosis. *Am J Obstet Gynecol*; 1997; 176: 360-8.
- 121) Wheeler JM and Malinak LR. Does mild endometriosis cause infertility? *Semin Reprod Endocrinol* 1988; 6: 239-49.
- 122) Wheeler JM. Epidemiology of endometriosis-associated infertility. *J Reprod Med* 1989; 34: 41-6.
- 123) Whiteside JL & Falcone T. Endometriosis-related pelvic pain: what is the evidence? *Clin Obst Gynecol* 2003; 46(4); 824-830.
- 124) Wingfield M, Macpherson A, Healy DL, Rogers PAW. Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril* 1995; 64: 340-6.
- 125) Witz CA; Cho S; Montoya-Rodriguez IA; Schenken RS. The $\alpha_2 \beta_1$ and $\alpha_3 \beta_1$ integrins do not mediate attachment of endometrial cells to peritoneal mesothelium. *Fertil. Steril.* 2002; 78(4): 796-803.
- 126) Witz CA. Cell adhesion molecules and endometriosis. *Sem Reprod Med* 2003; 21(2); 173-181.

ANEXOS

Anexo1: Termo de consentimento pós-informação

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campos Universitário Monte Alegre - Fone: 602-1000 - Fax: 633-1144

CEP: 14048-900 Ribeirão Preto - São Paulo.

ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA

Nome da pesquisa:

Proliferação celular e apoptose em endométrio tópico e ectópico de pacientes com endometriose peritoneal, ovariana e de septo reto-vaginal.

Pesquisador responsável:

Dra. Flávia Maciel de Aguiar – CRM/SP: 103.074.

1. Justificativa e objetivo da pesquisa:

A endometriose é uma doença que ainda não tem bem estabelecida a sua causa, o seu modo de agir e a sua cura. Milhares de estudos estão sendo realizados na tentativa de esclarecer todos estes aspectos tendo como principal finalidade encontrar uma cura para esta doença.

Queremos com este estudo avaliar o comportamento de sua lesão de endometriose e de seu endométrio (camada mais interna do útero) através de estudo histológico (estudo da microscopia das células) no sentido de entender melhor como e porque estas lesões surgem e como se comportam.

Para o diagnóstico de endometriose normalmente fazemos laparoscopia (cirurgia que se faz por um corte no umbigo e se observa a cavidade abdominal através de uma mini câmara). A certeza absoluta da presença da endometriose é dada pela análise microscópica de um pedacinho da lesão que é retirado durante a cirurgia (biópsia). Fazemos também biópsia do endométrio das pacientes com endometriose, pois parece que o endométrio de pacientes com endometriose pode ter propriedades diferentes dos endométrios de pacientes sem endometriose.

A proposta deste estudo é estudar um pouco mais este tecido de endométrio que será retirado, com o uso de técnicas que permitem ver como é a proliferação deste tecido, e estamos solicitando sua autorização para este estudo.

2. Os procedimentos que serão utilizados e seus propósitos:

Para se ter o diagnóstico de certeza da endometriose é necessário realizar laparoscopia, uma cirurgia geralmente sob anestesia geral, na qual se introduz uma mini câmara pelo umbigo. Para esta cirurgia, indicada pela equipe médica que está acompanhando o seu caso, será dado um Termo de Consentimento específico. Como nem sempre só de olhar pode-se ter certeza que a doença está presente, é necessário retirar um pedacinho da lesão presente para mandar para exame. Pequena quantidade de lesão é necessária para diagnóstico. Geralmente sobra material que pode ser estocado em freezer para estudar outras coisas e é isso que estamos propondo neste estudo, utilizar este material que sobra para avaliar a proliferação da lesão.

Para estudar o endométrio, é necessário realizar uma biópsia dentro do útero. Neste estudo, ela será feita após a laparoscopia, quando você ainda estiver anestesiada.

Os pedacinhos de lesões de endometriose e de endométrio colhidos ficarão armazenados no freezer e serão todos juntos enviados para análise no laboratório. Será estudado o *índice de proliferação celular* e a *apoptose* para saber se a doença está em atividade

3. Os desconfortos e riscos esperados:

As biópsias do endométrio dentro do útero ou fora dele (que é a lesão da endometriose) têm como principal risco a perfuração do útero e, mais raramente pode ter infecção da cavidade uterina ou um pequeno sangramento. Estes riscos são pequenos.

Como os procedimentos serão todos realizados sob anestesia, não há nenhum desconforto devido a eles, e são procedimentos rápidos que não aumentam o tempo de cirurgia.

4. Formas de ressarcimento e indenização:

Não haverá recompensa financeira para os pacientes que participarem do estudo. Porém o preço dos medicamentos para tratamento da endometriose é alto e nem todos eles são fornecidos pelo SUS. Todos os medicamentos utilizados neste estudo para o seu tratamento da endometriose serão fornecidos de graça.

Quanto à indenização, esclarecemos que se trata de um projeto sem financiamento externo e que será desenvolvido com recursos próprios da instituição. Assim sendo, não há uma previsão de seguro para cobertura de indenização. Neste sentido, este projeto não se diferencia dos outros que não contam com financiamento externo, e que ainda assim, são regularmente desenvolvidos sob responsabilidade do pesquisador e da Instituição correspondente. Entretanto, em nenhum momento desconsidera-se o direito da paciente obter indenização por eventuais danos que julgar pertinente.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Flávia Maciel de Aguiar
Pesquisadora Responsável
CRM/SP 103.074
Fone para contato: (16)91767273 ou (16) 602 2815

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,

RG N° _____, abaixo assinada, tendo sido devidamente esclarecida sobre todas as condições que constam no documento “ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA”, de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado “Proliferação celular e apoptose em endométrio tópico e ectópico de pacientes com endometriose peritoneal, ovariana e de septo reto-vaginal” que tem como pesquisador responsável a Sra. Flávia Maciel de Aguiar, especialmente no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos que serei submetida, aos riscos e aos benefícios, à forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como a forma de indenização por danos decorrentes da pesquisa, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa a que serei submetido;
2. A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso me traga qualquer prejuízo;
3. A segurança de que não serei identificada e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade;
4. O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando;
5. O compromisso de que serei devidamente acompanhada e assistida durante todo o período de minha participação no projeto;

Declaro ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Assinatura da paciente