

ANA CAROLINA MACHADO POPPE

**Avaliação de marcadores relacionados à
transição epitélio-mesênquima na endometriose pélvica**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
a obtenção do título de Mestre em Ciências**

Programa de: Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Simões Abrão

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Poppe, Ana Carolina Machado

Avaliação dos marcadores relacionados à transição epitélio-mesênquima na endometriose pélvica / Ana Carolina Machado Poppe. -- São Paulo, 2013.

**Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.**

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Maurício Simões Abrão.

Descritores: 1.Endometriose 2.Transição epitelial-mesenquimal 3.E-caderinas
4.N-caderinas 5.Beta-catenina 6.Receptores estrogênicos 7.Receptores de
progesterona

USP/FM/DBD-408/13

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, excepcional, pelo apoio incondicional.

À minha mãe, que eu tenho certeza, estaria muito orgulhosa.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Antonio, que viveu comigo cada dia deste trabalho, que compartilhou cada conquista, cada etapa cumprida, cada problema, cada obstáculo. Cada decepção, e cada alegria. Você é meu exemplo, meu amigo, meu herói. Eu nunca conseguirei agradecer por tudo isso. Te amo demais.

À minha mãe, Sueli, por ter me dado a melhor educação do mundo, pelo amor, carinho e dedicação que sempre teve, mas principalmente pela proteção da onde quer que esteja. A palavra saudades não é suficiente.

Ao meu irmão, Allan, por me escutar por tanto tempo falando deste trabalho. Por me mostrar, mesmo sem querer, uma visão diferente das coisas, sendo a pessoa mais diferente e mais parecida comigo no mundo.

Ao meu orientador, Professor Doutor Mauricio Simões Abrão, a quem tenho grande admiração por sua inteligência e competência, obrigada pela disponibilidade, pelos ensinamentos, e pelo apoio desde o início da minha vida profissional.

À Doutora Renata Coudry, por ser a grande responsável pela viabilização deste trabalho e, sobretudo pela paciência, compreensão e atenção concedida principalmente nos momentos difíceis.

Ao Professor Doutor Sergio Podgaec, pela disponibilidade em me ajudar em momentos cruciais, a sua orientação e auxílio na execução deste trabalho foi fundamental. Obrigada por tudo.

Ao Professor Doutor Edmundo Chada Baracat, pela oportunidade de realizar pós-graduação na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela colaboração e disponibilidade.

Ao Doutor João Antonio Dias, uma das pessoas que mais contribuiu para esse trabalho ter se concretizado, as suas palavras de compreensão e incentivo fizeram muita diferença.

À Annacarolina Silva, patologista e amiga, pelas contribuições ao trabalho tanto na parte prática como na teórica, me apoiando e auxiliando em todos os momentos.

Aos amigos de trabalho, Patrick Bellelis e Luciano Gibran, por compartilharem comigo as conquistas e dificuldades da pós-graduação, ao Luiz Carvalho, por me ajudar em momentos importantes, me orientando “cientificamente”, e também à Lidia Myung, Paula Fagundes, Daniel Caraça e Luiz Flavio Fernandes, por inúmeros momentos de alegria no trabalho.

Aos amigos, que compreenderam a ausência, os momentos de nervosismo, e os desabafos, e me fizeram tantas e tantas vezes continuar acreditando que não só este trabalho, mas que a vida vale a pena. São eles:

Mariana Peres, Luciana Paiva e Sandra Cremonese, cumplicidade, compreensão, companheirismo e muito carinho, nossa amizade é uma “jóia rara”, obrigada por estarem na minha vida.

À Bruna Fernandes, Luciana Cazoto, Maria Isabel Bertacchi, Ciamara Perroni, Patricia Teixeira, Raquel Campos, Maria Cristina Bonfiglioli, Fernando Carelli, vocês fazem parte da minha historia, do meu presente e tenho certeza que do meu futuro, amo vocês demais, sempre e para sempre.

Ao Christian Campero, Daniel Basseto, por me emprestarem o ombro para chorar e conseguirem me fazer sorrir.

Ana Paula Paranhos, Mariana Massarenti, Fernanda Borges, Luciano Rais, Rafael Pimentel, Guilherme Borin, companheiros de vida, de momentos bons e ruins, de conversas, discussões e comemorações, vocês são mesmo “a família que escolhemos”, amizades para o resto da vida.

Ao Guilherme Martins, Marcella Eboli, João Vilhena, por não desistirem de mim, apesar de toda ausência, e continuarem a ser meus companheiros de sempre.

À Claudia Affonso, pois sem seus conselhos e seu apoio, talvez esse trabalho não tivesse sido finalizado. Devo uma parte disso à você. Obrigada por isso, e por todo o resto.

Ao Instituto Sírio-Libanês de Ensino e Pesquisa - Hospital Sírio-Libanês, pelo auxílio na execução deste trabalho, especialmente à Ana Claudia Sanguin e ao Luiz Fernando Reis pela disponibilidade, apoio e colaboração sempre que necessário.

À Comissão Examinadora, pela disponibilidade e pelas críticas, sugestões e comentários que em muito contribuirão para que eu continue me empenhando na carreira.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Às pacientes que aceitaram fazer parte desse estudo, sem as quais nada do que fazemos teria sentido

EPÍGRAFE

“O que é necessário não é a vontade de acreditar, mas o desejo de descobrir”

Bertrand Russell

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

RESUMO

Poppe A.C.M. Avaliação de marcadores relacionados à transição epitélio-mesênquima na endometriose pélvica [dissertação]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

Introdução: A endometriose é uma doença ginecológica comum caracterizada pela presença de estroma e/ou glândula endometrial fora da cavidade uterina, e que não possui sua etiopatogenia bem estabelecida. A transição epitélio-mesênquima (TEM) é um processo que consiste em uma série de mudanças no fenótipo de células epiteliais que fazem com que estas células assumam características de células mesenquimais. Assim como observado na TEM, as células endometriais no contexto da endometriose apresentam capacidade migratória, invasibilidade e elevada resistência à apoptose. As moléculas de adesão têm adquirido crescente relevância na TEM, pois relacionam-se à perda de adesão célula-célula com o aumento da invasão e metástase. O objetivo deste estudo foi investigar a expressão de marcadores relacionados com a TEM na endometriose superficial, ovariana e profunda.

Pacientes e Métodos: Foram selecionadas 103 mulheres que preenchiam os critérios de inclusão estabelecidos, constituindo 2 grupos de estudo independentes entre si: 18 mulheres com endometriose peritoneal, ovariana e profunda concomitantes; 85 mulheres com endometriose ovariana e/ou profunda, dividido em 44 mulheres com endometriose ovariana e 41 com endometriose intestinal. Através de reações de imunistoquímica, a expressão proteica dos marcadores e-caderina, n-caderina, beta-catenina, receptor de estrogênio e receptor de progesterona foram avaliados nos tecidos de interesse em cada grupo de estudo. Além dos locais de doença, as mulheres foram avaliadas quanto à relação com a fase do ciclo e à classificação histológica da doença.

Resultados: As lesões de endometriose de ovário mostraram uma menor expressão de n-caderina em comparação às lesões de intestino e peritônio ($p=0,032$). O receptor de estrogênio e receptor de progesterona se mostraram significativamente menos expressos no componente epitelial da doença de ovário do que no epitélio da endometriose de peritônio e intestino ($p=0,002$; $p=0,48$). A expressão da n-caderina apresentou uma correlação direta com a expressão do receptor de estrogênio no estroma da endometriose de intestino ($p=0,036$).

Conclusão: Estes resultados sugerem que a transição epitélio-mesênquima esteja envolvida na etiopatogenia da endometriose, demonstrando que a doença de ovário se comporta de maneira diferente da doença superficial e da doença infiltrativa profunda, sendo a n-caderina um importante fator envolvido neste processo possivelmente influenciada pela ação do estrogênio.

Descritores: endometriose, transição epitélio-mesênquima, E-caderina, N-caderina, Beta-catenina, Receptor de Estrogênio e Receptor de Progesterona.

ABSTRACT

Poppe A.C.M. Evaluation of markers related to epithelial-mesenchymal transition in the patients with pelvic endometriosis [dissertação]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

Background: Endometriosis is a common gynecological disease defined as the presence of ectopic endometrial glands and stroma outside the uterine cavity, and its pathogenesis is not well established. The epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a process consisting of a series of changes in the phenotype of epithelial cells that make these cells assume the characteristics of mesenchymal cells. As observed in the EMT, endometrial cells in the context of endometriosis have the capacity of migration, invasiveness and high resistance to apoptosis. . The adhesion molecules have become progressively relevant in EMT, in view of the cell-to-cell adhesion loss, with increased invasion and metastasis. The goal of this study was to investigate the expression of markers related to EMT in superficial, ovarian and deep endometriosis.

Patients and Methods: 103 women were selected who met the inclusion criteria, constituting two independent study groups: 18 women with peritoneal, ovarian and deep concomitant endometriosis, 85 women with ovarian and / or deep endometriosis, divided in 44 women with ovarian endometriosis and 41 with intestinal endometriosis. Through immunohistochemical reactions, the protein expression of e-cadherin, n-cadherin, beta-catenin, estrogen receptor and progesterone receptor markers were evaluated in tissues of interest in each study group. In addition to the sites of the disease, menstrual phase and histological classification (well-differentiated, undifferentiated, mixed pattern and stromal) of the disease were recorded.

Results: The ovarian endometrisis showed less n-cadherin marker than lesions of the peritoneum and bowel ($p=0,032$). Ovarian endometriosis also showed markedly decreased expression of estrogen and progesterone receptors in epithelial cells, compared with peritoneal and deep endometriosis ($p=0,002$; $p=0,48$). The expression of N-cadherin showed a direct correlation with estrogen receptor expression in the stroma of bowel endometriosis ($p = 0.036$).

Conclusion: These results suggest that epithelial to mesenchymal transition involved in the pathogenesis of endometriosis, demonstrating that the ovary disease behaves differently disease than peritoneal and deep disease, so that the n-cadherin is an important factor involved in this process, possibly influenced by the action of estrogen.

Descriptors: Endometriosis, epithelial-mesenchymal transition, E-cadherin, N-cadherin, beta-catenin, Estrogen Receptor and Progesterone Receptor.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

INTRODUÇÃO	16
1. Endometriose	16
1.1 Etiopatogenia	18
2. Transição epitélio-mesênquima	20
2.1 E-caderina, n-caderina e beta-catenina	23
2.2 Receptor de estrogênio e receptor de progesterona	25
3. Transição epitélio-mesênquima e câncer	28
4. Transição epitélio-mesênquima e endometriose	29
OBJETIVOS	33
PACIENTES E MÉTODOS	35
Análise estatística.	44
RESULTADOS.	46
DISCUSSÃO.	60
CONCLUSÃO.	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	72
ANEXOS.	84

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fatores indutores da TEM fazem com que as células epiteliais percam as junções aderentes, induzindo a perda da polaridade celular, e consequentemente a constrição apical, a remodelação do citoesqueleto celular, a desorganização da membrana basal e por fim, possibilitando que ocorra a migração através da matriz extracelular e a invasão de tecidos adjacentes. (Fonte: figura adaptada de Acloque et al, 2009).....22
- Figura 2 - Células epiteliais normais possuem junções aderentes que são formadas por caderinas (e-caderina ou n-caderina), cateninas (beta-cateninas) e actina, além de complexos de polaridade apical e integrinas que interagem com a membrana basal. (Fonte: figura adaptada de Acloque et al, 2009)24
- Figura 3 - Representação esquemática da dinâmica do estudo.38
- Figura 4 - Classificação da endometriose proposta pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) (revisada em 1996).....40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos anticorpos relacionados avaliados.....	41
Tabela 2 – Descrição da idade, paridade, IMC, estágio, sintomas e infertilidade das pacientes de acordo com os três grupos de estudo.	46
Tabela 3 - Avaliação das medianas da fase do ciclo menstrual nas pacientes com endometriose peritoneal, ovariana e intestinal concomitantes (grupo 1).	48
Tabela 4 - Avaliação das medianas da fase do ciclo menstrual nas pacientes com endometriose ovariana (grupo 2A).	49
Tabela 5 - Avaliação das medianas da fase do ciclo menstrual nas pacientes com endometriose intestinal (grupo 2B).	49
Tabela 6 - Comparação da expressão proteica da n-caderina, e-caderina e beta- catenina nos diferentes sítios de doença e no epitélio e estroma nas pacientes do grupo 1 (endometriose peritoneal, ovariana e intestinal concomitantes).	50
Tabela 7 - Comparação da expressão proteica da n-caderina, e-caderina e beta- catenina nos diferentes sítios de doença e no epitélio e estroma nas pacientes dos grupos 2A e 2B (endometriose ovariana e intestinal independentes).	52
Tabela 8 - Comparação da expressão proteica dos receptores de estrogênio e progesterona nos diferentes sítios de doença e no epitélio e estroma nas pacientes do grupo 1 (endometriose peritoneal, ovariana e intestinal concomitantes).	53
Tabela 9 - Comparação da expressão proteica dos receptores de estrogênio e progesterona nos diferentes sítios de doença e no epitélio e estroma nas pacientes dos grupos 2A e 2B (endometriose ovariana e intestinal independentes).	54
Tabela 10 - Avaliação das medianas da expressão proteica dos marcadores de acordo com a classificação histológica da endometriose nas pacientes com endometriose peritoneal, ovariana e intestinal concomitantes (grupo 1).	56
Tabela 11 - Avaliação das medianas da expressão proteica dos marcadores de acordo com a classificação histológica da endometriose nas pacientes com endometriose ovariana (grupo 2A).	57

Tabela 12 - Avaliação das medianas da expressão proteica dos marcadores de acordo com a classificação histológica da endometriose nas pacientes com endometriose intestinal (grupo 2B).....	57
---	----

INTRODUÇÃO

1. Endometriose

A endometriose é uma doença caracterizada pelo implante de tecido do tipo endometrial, células epiteliais e/ou estromais, em regiões extrauterinas e é considerada como uma das principais causas de dor pélvica e infertilidade em mulheres em idade reprodutiva, (Olive; Pritts, 2001; Giudice; Kao, 2004). Acomete com mais frequência ovários e ligamentos útero-sacros e também pode afetar porções do tubo digestivo ou do trato urinário, tendo sido descrita até mesmo em sítios fora da cavidade abdominal como pulmão e cérebro (D'Hooghe; Debrock, 2002; Donnez; Langendonckt, 2004).

Estima-se que esta doença afete de 10 a 15% da população feminina na menacme, o que significa cerca de 7 milhões de mulheres nos Estados Unidos, e de mais de 70 milhões no mundo, sendo uma das principais causas das hospitalizações por causas ginecológicas (Giudice; Kao, 2004; Vercellini et al, 2007). Entretanto, por ser uma doença com difícil diagnóstico e tratamento, a endometriose causa grande morbidade às mulheres portadoras da doença, pois as mesmas podem percorrer hospitais e consultórios por até sete anos até que o diagnóstico e tratamento adequados sejam estabelecidos (Arruda et al., 2003).

Desde as primeiras descrições da doença realizadas por Von Rokitansky (1860), a endometriose tem se mostrado uma doença de difícil abordagem diagnóstica e terapêutica. Apesar de diversos estudos tentarem encontrar métodos não invasivos que permitam o diagnóstico e o tratamento da doença, estes ainda dependem de métodos invasivos, como a vídeo-laparoscopia que possibilita o diagnóstico definitivo pela visualização e exérese da lesão e sua subsequente confirmação histológica (Podgaec et al., 2007).

Na tentativa de esclarecer aspectos ainda obscuros como sua etiologia, os fatores de risco de desenvolvimento da doença e sua relação com a infertilidade, a endometriose tem sido amplamente estudada nos últimos 20 anos em relação a seus aspectos clínicos, etiopatogênicos e suas repercussões à qualidade de vida da paciente (Abrão et al., 2003; Abrão et al., 2004; Pupo-Nogueira et al., 2007).

Dismenorreia, dispareunia profunda, dor pélvica crônica, sangramento anormal e infertilidade são os principais sintomas associados à endometriose (Kennedy et al., 2005). Sintomas intestinais como disquezia, hematoquezia, obstipação intestinal e distensão abdominal, além de sintomas urinários como disúria e hematúria também

podem ocorrer dependendo da localização das lesões (Abrão et al, 2009; Kennedy et al., 2005; Podgaec et al, 2007).

De acordo com Eskenazi et al (2001), a presença de um entre os principais sintomas (dismenorreia, dispareunia, infertilidade, dor acíclica, alterações urinárias ou intestinais cíclicas) apresenta 76% de sensibilidade e 58% de especificidade no diagnóstico da doença. Sendo a dismenorreia o sintoma predominante, manifestando-se em diferentes intensidades, a infertilidade secundária à efeitos inflamatórios, a dor acíclica decorrente de aderências, inflamação e infiltração de feixes nervosos, e as queixas urinárias e gastrointestinais são cíclicas pois apresentam intensidade maior em determinado período do ciclo menstrual (Eskenazi et al, 2001; Wu et al, 2002; Siristatidis et al, 2006).

Baseado na observação de diversos aspectos da doença, Nisolle e Donnez (1997) propuseram que a endometriose se apresenta como três doenças distintas, com diferentes patogêneses: doença peritoneal, ovariana e endometriose de septo retovaginal. A doença peritoneal, ou superficial, consiste na presença de focos superficiais da doença; a doença ovariana inclui implantes superficiais ou cistos ovarianos conhecidos como endometriomas ou “cistos chocolate“ e a doença de septo retovaginal corresponderia a doença profunda, com mais de 5mm de profundidade, acometendo o compartimento posterior da pelve. (Nisolle; Donnez,1997; Dias et al., 2006).

A Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) estabeleceu classificação para a endometriose, dividindo-a em quatro estádios (I-IV) resultantes da quantificação de pontos de acordo com a quantidade e tamanho dos focos de doença, e com a presença de aderências, sendo o estágio IV o mais avançado (Revised American Society for Reproductive Medicine, 1996).

Quanto às características morfológicas, a endometriose se mostra uma doença bastante heterogênea, podendo ser encontrada como implantes polipóides, como estruturas císticas, ou como invasões do tecido conjuntivo sub-peritoneal, ou apresentar lesões fibróticas e inflamatórias (Carvalho; Abrão, 2000). Na interface entre o foco do tecido heterotópico e o tecido do órgão acometido, podem ser encontradas células fibroblásticas, musculares, endoteliais e hemossiderófagos como sinais de hemorragia (Kamergorodsky et al., 2009).

A classificação histológica possui uma relevante importância no entendimento da doença, podendo fornecer informações adicionais com relação ao prognóstico da doença de acordo com o grau de semelhança das lesões com o endométrio típico (Abrão et al, 2003). A partir do entendimento de que o tecido endometrial é dividido em dois componentes: estroma e epitélio, classificou-se o tecido epitelial em padrões bem diferenciado, indiferenciado e misto, de modo que a doença que apresenta os padrões indiferenciado e misto esteve associada à maior intensidade da dor (Abrão et al., 2003).

Embora considerada uma doença benigna, a endometriose apresenta características semelhantes a uma doença maligna, tais como, um desregulado crescimento celular, invasibilidade e capacidade de neoangiogênese, podendo se desenvolver como uma doença local ou apresentar diversos focos associados, o que sugere que ocorra uma mobilidade de suas células (Abrão et al, 2006; Thomas; Campbell, 2000a; Thomas; Campbell, 2000b).

1.1 Etiopatogenia

Diversos estudos estão se concentrando na busca dos mecanismos pelos quais determinadas mulheres desenvolvem a endometriose, o que poderia contribuir para uma melhor abordagem no diagnóstico e tratamento (Giudice; Kao, 2004). Neste contexto, algumas teorias para explicar o desenvolvimento da endometriose foram propostas, embora nenhuma delas consiga explicar completamente a etiopatogenia da doença. Dentre as teorias, duas correntes de hipóteses etiopatogenicas se destacam há quase um século: a teoria da metaplasia celômica (Meyer, 1919), e a teoria da menstruação retrógrada (Sampson, 1927).

A teoria da metaplasia celômica, de Meyer (1919), contribuiu para tentar elucidar a etiopatogenia da endometriose, sugerindo que os focos de endométrio ectópico se originam por meio da diferenciação de células epiteliais em células características do tecido endometrial. Esta teoria parte do princípio de que o epitélio celômico dá origem a diversos epitélios do corpo humano, entre eles o epitélio germinativo ovariano, o endométrio e o peritônio. Por terem a mesma origem e por serem constituídos de células pouco diferenciadas, estes epitélios seriam susceptíveis a sofrer transformações patológicas induzidas por estímulos inflamatórios e hormonais, dando origem às células ectópicas do endométrio, e posteriormente às lesões de endometriose (Meyer, 1919).

A teoria da menstruação retrógrada, sugerida por Sampson (1927), consiste na implantação das células endometriais em sítios extrauterinos por meio do refluxo do sangue menstrual pelas trompas uterinas para a cavidade abdominal, o que dependeria de um ambiente hormonal favorável e de condições imunológicas específicas que fizessem com que estas células não fossem eliminadas do local impróprio, já que estima-se que 70 a 90% das mulheres saudáveis apresentam refluxo de sangue menstrual, e nem todas desenvolvem a doença (Weed; Arquembourg, 1980; Missmer; Cramer, 2003; Siristatidis et al., 2006). Evidências como a localização predominante da doença nos ovários e nos ligamentos útero-sacros, onde o refluxo de sangue menstrual ficaria acumulado em maior quantidade, reforçam esta teoria (Sampson, 1927; Giudice; Kao, 2004).

Contudo, estas teorias não são suficientes para explicar completamente os casos em que a endometriose acomete sítios distantes, como diafragma, pulmão, cérebro e nervos periféricos, ou nos raros casos identificados de endometriose em homens (Donnez; Langendonckt, 2004). Deste modo, outros autores propõe que o tecido endometrial pode ser disseminado pela via linfática ou ainda pela via hematogênica, Abrão et al (2006) conseguiram identificar células endometriais nos linfonodos em um terço de pacientes com endometriose intestinal.

Mais recentemente estudos vêm contribuindo para desvendar os mecanismos etiopatogênicos da endometriose, na tentativa de esclarecer os fatores que levam as células endometriais a sobreviver em um ambiente estranho, implantar e invadir o epitélio, criar uma neurovascularização local e continuar crescendo continuamente (Burney; Giudice, 2012). Entre as linhas de pesquisa, destacam-se as que envolvem fatores genéticos hereditários ou adquiridos que predispõe ao desenvolvimento da doença, o sistema imunológico que permite a sobrevivência das células endometriais em um ambiente ectópico e alterações moleculares que expliquem a adesão, infiltração e neurovascularização dos tecidos lesionados (Burney; Giudice, 2012).

Em condições normais as células endometriais são eliminadas do ambiente ectópico pelo sistema imunológico e a desregulação deste mecanismo parece ser uma das causas do desenvolvimento da endometriose que permitiria não só a implantação destas células como o seu contínuo crescimento. Alterações genéticas podem estar presentes tanto nas células do endométrio eutópico como no epitélio peritoneal, como no mecanismo imunológico em questão, podendo ser adquiridas, como no caso do

endométrio, que por ser um tecido que apresenta grande capacidade de renovação celular, se torna vulnerável a erros genéticos; e hereditária demonstrada pelo risco de desenvolvimento da doença que parece ser seis vezes maior em mulheres com parentes afetadas do que em familiares de mulheres não afetadas pela doença (Burney; Giudice, 2012; Simpson et al, 1980). Diversas moléculas têm sido estudadas para evidenciar a criação de um microambiente que estimula a implantação das células ectópicas e as protege da eliminação pelo sistema imunológico, como por exemplo, as metaloproteinases de matriz (MMPs), os fatores de crescimento (TGF-beta, VEGF, IGF e EGF), e as interleucinas (Burney; Giudice, 2012).

Em todas as teorias descritas acima, a origem e a evolução da endometriose dependeriam da existência de células com características de células menos diferenciadas, que teriam habilidades de migração, adesão, invasibilidade e proliferação, e o mecanismo pelo qual as células endometriais adquirem estas características no desenvolvimento da endometriose permanecem obscuros.

2. Transição Epitélio-Mesênquima (TEM)

Estudos recentes têm relacionado propriedades de maior capacidade migratória, capacidade de invasão e elevada resistência a apoptose que alguns tipos celulares adquirem com um processo biológico denominado transição epitélio-mesênquima (TEM) (Kalluri; Neilson, 2003). A TEM consiste de uma série de mudanças no fenótipo de células epiteliais que fazem com que estas células assumam características de células mesenquimais (Kalluri; Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009).

As células epiteliais e as células mesenquimais são os principais tipos celulares que compõe os organismos multicelulares, diferindo entre si tanto morfológica como funcionalmente. As células epiteliais formam camadas de células justapostas, ligadas entre si por complexos de adesão celular, *tight junctions*, *adherens junctions*, *gap junctions* e desmossomos, e apresentam uma polaridade apicobasal ligadas à matriz, o que separa o tecido epitelial dos demais tecidos, e as células mesenquimais podem ser encontradas como células individuais movendo-se por toda a matriz, pois não possuem ligações entre si e não apresentam polaridade celular (Acloque et al, 2009; Thiery et al, 2009).

Em etapas específicas da embriogênese e do desenvolvimento de órgãos, as células de certos epitélios possuem uma capacidade diferenciada de transformação, de modo que parecem alternar entre as características de células epiteliais e células mesenquimais, ou seja, indo e voltando no processo de transição epitélio-mesênquima (TEM). Esse mecanismo demonstra que esta série de mudanças pode ser reversível, caracterizando também o processo contrário, denominado transição mesênquima-epitélio (TME) (Lee et al., 2006; Gomes et al., 2011).

Conhecidas por sua plasticidade fenotípica devido ao seu aparente envolvimento com a regeneração de tecidos, as células epiteliais são células justapostas, polarizadas, unidas entre si através complexos de moléculas de adesão, que interagem com a membrana basal dos tecidos através de sua aderência à superfície, formando camadas de revestimento de diversas estruturas do corpo (Zeisberg; Neilson, 2009).

Esta plasticidade se deve justamente à possibilidade da TEM, processo pelo qual as células epiteliais passariam por diversas mudanças, como a perda da capacidade de adesão celular e da sua polaridade, como o rompimento da membrana basal e constrição apical, que as tornariam fenotipicamente semelhantes às células mesenquimais, com capacidade de locomover-se e de invadir outros tecidos, sofrendo o fenômeno de desdiferenciação, ou seja, um processo em que uma célula diferenciada, com função específica, se transforma em uma célula não especializada, com características mais primitivas (Acloque et al., 2009; Thiery et al., 2009). Ainda que este comportamento migratório não seja exclusivo das células mesenquimais, em geral estas células apresentam uma motilidade e plasticidade superior às células epiteliais, tornando as características de migração e invasibilidade estreitamente relacionadas a TEM (Gomes et al, 2011; Thompson et al, 2005).

A TEM foi identificada em diferentes situações biológicas com diferentes funcionalidades, o que levou autores a dividi-la em três subtipos de acordo com o processo em que estão envolvidas (Kalluri; Weinberg, 2009; Zeisberg; Neilson, 2009): a- implantação e a formação do embrião (Kalluri; Neilson, 2003; Kalluri; Weinberg, 2009); b- cicatrização e reparação de tecidos lesados (Iwano et al., 2002); c- comportamento invasivo e metastático de neoplasias (Kiemer et al., 2001).

A metástase é um processo que consiste na difusão de células do tumor e invasão de órgãos distantes (Geiger; Peeper, 2009). Este processo depende de um conjunto de células especializadas capazes de completar todas as etapas da cascata metastática, que

inclui a migração do local primário do tumor, a invasão da membrana basal e estroma local, interação e adesão do endotélio e proliferação em um tecido distante, (Thompson et al, 2005). Além do grande número de etapas que estas células têm que cumprir, para cada uma destas etapas da cascata metastática existem barreiras fisiológicas e imunológicas a serem superadas, o que mostra a complexidade deste processo (Bacac; Stamenkovic, 2008; Geiger; Peeper, 2009). Portanto, em diversos estágios do processo de metástase as células têm que passar por alterações na polaridade celular, alterações na motilidade e alterações nas interações célula-célula e célula-matriz, o que relaciona este processo com a TEM, já que estas células aumentam sua capacidade de motilidade e invasibilidade (Gomes et al, 2011).

Diversos estudos vêm demonstrando que uma série de processos moleculares e bioquímicos são necessários para que se inicie e se desenvolva a TEM (figura 1), os quais podem ser ativados por uma associação entre a reparação tecidual e stress, observados em alguns tipos de inflamação (Gomes et al., 2011). Entre estes processos moleculares estão: a ativação de fatores de transcrição, a alteração da expressão de proteínas específicas de superfície celular, a diminuição e aumento de certas proteínas do citoesqueleto, a produção de enzimas de degradação da membrana extra-celular e alterações na expressão de microRNAs específicos (Kalluri; Weinberg, 2009).

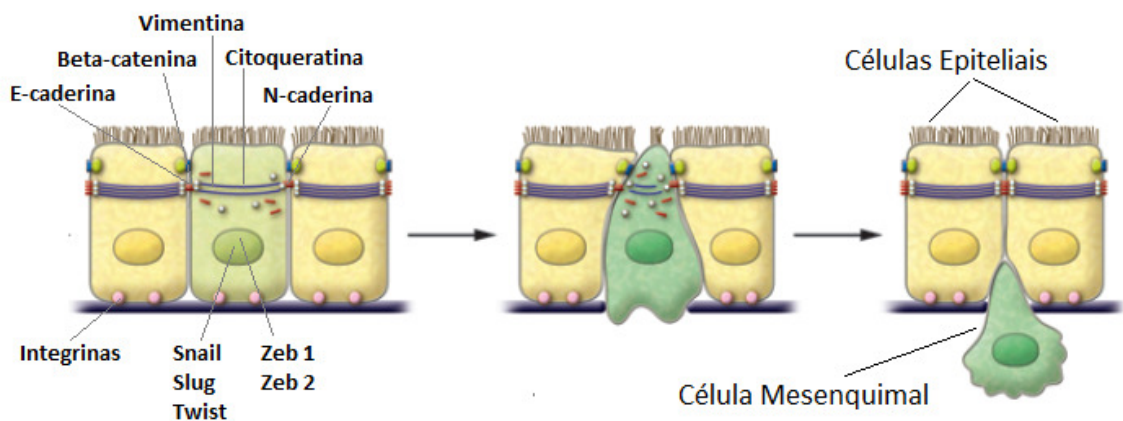


Figura 1 - Fatores indutores da TEM fazem com que as células epiteliais percam as junções aderentes, induzindo a perda da polaridade celular, e conseqüentemente a constrição apical, a remodelação do citoesqueleto celular, a desorganização da membrana basal e por fim, possibilitando que ocorra a migração através da matriz extracelular e a invasão de tecidos adjacentes. (Fonte: figura adaptada de Acloque et al, 2009)

As moléculas de adesão celular são glicoproteínas expressas na superfície celular, responsáveis pela conexão entre duas células ou entre células e a matriz celular. Pelo menos quatro classes de moléculas de adesão são conhecidas: integrinas, selectinas, imunoglobulinas e as caderinas, sendo estas últimas as moléculas que têm adquirido crescente relevância na TEM, pois relaciona-se a perda de adesão célula-célula com o aumento da invasão e metástase. De acordo com alguns autores, a perda da função da e-caderina, uma molécula de adesão celular, é um fator crucial para o processo da TEM (Jeanes et al., 2008; Moreno-Bueno et al., 2008). Além da e-caderina, outras moléculas de adesão da mesma família, a n-caderina e a beta-catenina, têm se mostrado com expressão alterada em neoplasias epiteliais infiltrativas, mostrando as suas importâncias na alteração da capacidade metastática de alguns tipos de células malignizadas (Qi et al, 2005).

As respostas celulares envolvidas no processo da TEM podem ser mediadas por diversos fatores, entre eles, estão os fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas (Gomes et al, 2011). Sendo a endometriose uma doença complexa dependente de hormônios esteroides, a alteração nos receptores de estrogênio e progesterona pode ser uma importante influência na mediação da atividade desses hormônios no desenvolvimento da TEM no endométrio tópico e ectópico nas mulheres com endometriose (Wang et al, 2013).

2.1 E-caderina, N-caderina e Beta-catenina

As caderinas são moléculas localizadas na superfície celular, que possuem a função de adesão celular, e são essenciais para manter a polaridade celular e para o desenvolvimento e arquitetura dos tecidos (Patten et al, 2010). A e-caderina e a n-caderina se ligam a outra molécula chamada beta-catenina, que consiste em um componente essencial das aderências epiteliais, pois liga as caderinas às actinas do citoesqueleto das células epiteliais, constituindo, portanto, uma subunidade do complexo de proteínas denominado 'junções aderentes' (figura 2), atuando como um transdutor de sinal intracelular (Acloque et al, 2009).

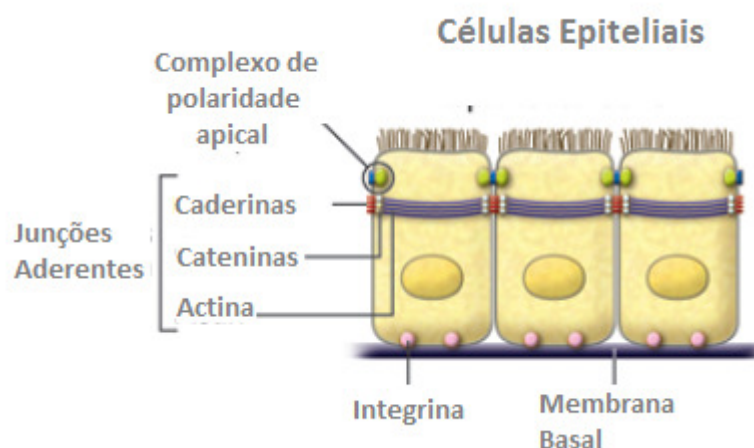


Figura 2 - Células epiteliais normais possuem junções aderentes que são formadas por caderinas (e-caderina ou n-caderina), cateninas (beta-cateninas) e actina, além de complexos de polaridade apical e integrinas que interagem com a membrana basal. (Fonte: figura adaptada de Acloque et al, 2009)

As 'junções aderentes', são essenciais para a criação e manutenção das camadas de células epiteliais através do controle do crescimento celular e da aderência célula-célula e a aderência célula-matriz de diversos tecidos maduros (Goodwin; Yap, 2004). Conforme dito anteriormente, a TEM consiste em mudanças pelas quais células epiteliais adquirem habilidades de células mesenquimais, como de invasão e migração, que incluem perda das interações célula-célula e da polaridade apico-basal, o que torna as proteínas e-caderina, a n-caderina e a beta-catenina particularmente relevantes quando se trata da TEM (Yoshida et al, 2012).

Especificamente, a diminuição da expressão da e-caderina parece ser fundamental para a passagem pela TEM, e especula-se ainda que possa ser o seu ponto de partida (Jeanes et al., 2008; Moreno-Bueno et al., 2008). Estudos têm mostrado que a e-caderina está reduzida em diversas malignidades humanas, o que sugere que esta ocorrência resulte em uma disfunção da junção célula-célula e desencadeie a invasão de tumores malignos (Peinado et al, 2007;. Kalluri; Weinberg, 2009; Yoshihara et al, 2009).

Alguns sinais já foram identificados como indutores ou participantes da TEM, muitos relacionados com a regulação de fatores de transcrição de genes epiteliais, como

os da codificação de e-caderina (Moreno-Bueno et al., 2008), alguns relacionados com a supressão da atividade do promotor de e-caderina, como Snail, Slug, Zeb, E47 e KLF8 (Bolos et al., 2003; Wang et al., 2007), e outros relacionados com a supressão indireta da transcrição da e-caderina, como Twist, Goosecoid, E2.2 e FOXC2 (Yang et al, 2004; Sobrado et al, 2009).

Com relação à beta-catenina, em resposta a sinais exógenos, esta proteína pode ser translocada da membrana celular para o citoplasma, onde pode ser degradada ou ainda transportada para o núcleo, podendo influenciar na expressão gênica, associada a diversas vias de sinalização, entre elas a indução da ocorrência da TEM, sendo, portanto, também uma molécula associada à regulação do fenótipo epitelial (Acloque et al, 2009).

Quanto à expressão destas moléculas no endométrio tópico, constatou-se que a e-caderina mostra-se intensa durante todo o ciclo e que a n-caderina parece variar entre as fases secretora e proliferativa (Poncelet et al, 2002; Paten et al., 2010).

Na endometriose os dados com relação à alteração, ou não, da e-caderina, da n-caderina e da beta-catenina ainda são inconsistentes, de modo que enquanto alguns autores encontraram alterações na expressão destas proteínas, outros não identificaram diferenças significativas (Patten et al, 2010; Matsuzaki; Darcha, 2012; Poncelet et al, 2002; Goodwin; Yap, 2004).

2.2 Receptor de Estrogênio e Receptor de Progesterona

Assim como os demais receptores, os receptores de estrogênio e de progesterona são proteínas presentes na membrana, no citoplasma ou no núcleo, que permitem a interação de determinadas moléculas, neste caso os hormônios, com os mecanismos celulares, desencadeando uma serie de eventos, entre eles, a multiplicação e o crescimento celular.

O estrogênio e a progesterona são hormônios cruciais para o controle das funções do endométrio ao longo do ciclo menstrual, regulando a expressão de milhares de genes através da ligação com seus receptores, RE e RP, respectivamente (Kao et al, 2002).

Com relação à endometriose, através dos indícios de que os sintomas da doença aparecem após a menarca e desaparecem após a menopausa; e de que a interrupção da

ovulação por gravidez, por medicamentos inibidores de estrogênio, contraceptivos orais ou progesterona reduz os sintomas da doença e até mesmo causam uma redução nas lesões; somado aos resultados de pesquisas clínicas, pode-se presumir o importante papel destes hormônios na patologia da doença (Olive et al, 2001; Missmer; Cramer, 2003; Kim et al 2013). Pode ser observado ainda, que quantidades significativas de estrogênio e progesterona são encontradas na região das lesões, aparentemente produzidas localmente por uma cascata anormal que inclui aromatase (Bulun et al, 2005).

É um consenso entre pesquisadores e médicos de que a endometriose é uma doença complexa dependente de hormônios, na qual, de acordo com vários estudos, o estrogênio desempenha um papel chave. O fato do crescimento dos implantes endometriais ser dependente de estrogênio é reforçado pelo aumento dos níveis de estrogênio locais mediados pela aromatase (Noble et al, 1996). Além dos níveis elevados de estrogênio locais, foi observado que a maior expressão do receptor de estrogênio no tecido endometrial esta correlacionado com a progressão da endometriose (Fujimoto et al, 1999; Han et al, 2012).

Foi demonstrado em modelos de endometriose em seres humanos e primatas que o estrogênio estimula o crescimento dos implantes, enquanto os inibidores de aromatase, que bloqueiam a formação do estrogênio, e as antiprogestinas tem ação terapêutica, o que tornou a terapia com inibidores de aromatase e inibidores da produção de estrogênio, importantes alternativas para o tratamento da endometriose, demonstrando uma regressão dos implantes e uma redução dos sintomas (Attar; Bulun, 2006; Murphy; Castellano, 1994; Ryan; Taylor, 1997; Wang et al, 2013).

O receptor de estrogênio desempenha um papel importante na sobrevivência e manutenção destes tecidos mediando a ação estrogênica tanto no endométrio tópico como no ectópico. O receptor de estrogênio (RE) se apresenta em duas formas o RE-alfa e o RE-beta, aparentemente com estruturas e funções diferentes, mas é o ER-alfa que possui associação com o aumento da sobrevida global e resposta favorável aos tratamentos clínicos no câncer (Golding et al, 1995; Shaw et al, 2002).

A progesterona é um hormônio esteroide essencial para as funções reprodutivas femininas, como a gravidez e lactação, ovulação, implantação, decidualização, parto e desenvolvimento mamário (Gellersen et al, 2009; Xie, 2012). Entretanto, os mecanismos complexos de ação deste hormônio tem sido difíceis de decifrar, por

diversos motivos, entre eles, pela diversidade de efeitos sobre os diferentes tecidos inclusive efeitos distintos sobre diferentes tipos de células num mesmo tecido, como é o caso das células estromais e epiteliais do endométrio (Kim et al 2013). Do mesmo modo, estudos demonstram que as respostas à progesterona são contraditórias em tecidos normais e doentes, como é o caso do câncer de mama, em que a progesterona parece promover seu crescimento, enquanto no câncer de endométrio estrogênio-dependente, sua ação parece ser protetora (Donnez et al, 2012; Poole et al, 2006; Heiss et al, 2008; Ishikawa et al, 2010).

Sobre a influência da progesterona na origem e desenvolvimento da endometriose, os dados são igualmente contraditórios. Primeiramente, a exposição à progesterona induz a diferenciação de células epiteliais e estromais, e a proliferação de células estromais durante a fase secretora. (Kim et al 2013) Por outro lado, relacionando-se a endometriose com o câncer de endométrio estrogênio-dependente, poderia ser dito que a progesterona possui um efeito protetor na doença, o que pode ser questionado pelas diversas diferenças entre estas patologias, mas pode ser reforçado pelos estudos que encontraram uma resposta escassa e uma expressão significativamente menor de marcadores relacionados a este hormônio na endometriose (Bulun et al, 2006; Yin et al 2007; Yin et al, 2012). Por último pode ser observado que somente cerca de metade das pacientes com endometriose que receberam algum tipo de tratamento relacionado à progesterona, parece ter apresentado benefícios (Vercellini, 1997; Vercellini, 2011).

As ações da progesterona são mediadas através de sua interação com seu receptor (RP), que pode ser encontrado expresso em duas isoformas chamadas RP-A e RP-B, as duas transcritas a partir do mesmo gene, mas com promotores distintos, conferindo-as tamanhos diferentes e, portanto, atividades de transcrição diferentes. Entretanto, pelo fato de possuírem grande similaridade, os estudos costumam compreender as duas formas deste receptor, sem distingui-las (Lessey et al, 1983; Kaster, 1990, Kim et al, 2013).

Por fim, apesar de os receptores hormonais de estrogênio e progesterona serem comumente expressos tanto nos tecidos endometriais tópicos quanto nos endometriais ectópicos, o conhecimento acerca da influência desses receptores na progressão da doença ainda não está completamente claro e pode trazer importantes contribuições no tratamento da doença.

Noel et al. (2010) investigaram a presença de receptores de estrogênio e progesterona, não no componente endometrial das lesões, mas no tecido fibromuscular, encontrado na interface entre o tecido acometido pela doença e o foco de tecido endometrial, e encontraram a presença desses receptores no músculo liso em lesões de ligamento útero-sacro, bexiga, colón e septo retovaginal.

Em um estudo com células epiteliais receptor-de-estrogênio-positivas realizado por Chen et al (2010), o estrogênio induziu alterações morfológicas destas células para um fenótipo semelhante a fibroblastos, passando a expressar marcadores de células mesenquimais e apresentando características de migração e invasibilidade.

3. Transição Epitélio-Mesênquima (TEM) e Câncer

O envolvimento da TEM na progressão e metástase de doenças neoplásicas tem sido amplamente estudado (Gomes et al, 2011). Autores encontram cada vez mais evidências de que a TEM desempenha um papel fundamental na progressão de tumores e metástase, processo que consiste na difusão de células do tumor e invasão de órgãos distantes (Bacac, 2008).

Alterações na polaridade da célula epitelial e na capacidade de motilidade e invasibilidade celular, características estreitamente relacionadas com o processo da TEM, são essenciais em várias etapas do processo de metástase, além de que parecem existir diversas moléculas em comum envolvidas em vias de transdução de ambos os processos, como fatores de crescimento, citocinas, metaloproteinases de matriz, receptores tirosina quinase e microRNAs (Yang, 2008; Gomes et al, 2011). Entre os diversos estudos relacionando a TEM com câncer, Alves et al (2013) investigaram a expressão de um gene chamado *Hotair*, que tem sido associado com o processo de metástase e com o mau prognóstico em diferentes tipos de tumores, no contexto da TEM e das chamadas células-tronco cancerosas, e sugeriram que a alteração na expressão deste gene esteja envolvido no controle dos múltiplos mecanismos relacionados com o processo da TEM na gênese de tumores.

Em conjunto, estes dados sugerem que os fatores envolvidos no processo da TEM possuem um papel essencial na progressão e metástase de tumores, o que pode vir a ser uma importante alternativa de tratamento da doença (Gomes et al, 2011).

4. Transição Epitélio-Mesênquima (TEM) e Endometriose

Até o momento, poucos estudos relacionaram o processo da TEM com a endometriose. Entre eles, Patten et al (2010) analisaram a expressão da e-caderina, da n-caderina e da beta-catenina por imunistoquímica, em 14 casos de endometriose peritoneal, 21 casos de endometriose gastrointestinal, 3 casos de carcinoma endometrióide de cólon e compararam com 10 casos de endométrio proliferativo, 16 de endométrio secretor e 13 de adenomiose.

Este estudo encontrou uma diminuição significativa da expressão da n-caderina nos focos de endometriose peritoneal e profunda quando comparados ao endométrio proliferativo normal, e uma expressão difusa e variável da e-caderina tanto em endométrio tópico quanto ectópico. Ainda de acordo com os mesmos autores, existe uma diminuição na expressão da n-caderina no endométrio secretor quando comparado ao endométrio proliferativo, e os carcinomas endometrióides apresentaram a perda total da expressão de n-caderina (Paten et al., 2010).

Já que as caderinas são proteínas cruciais para manter a aderência celular e a alteração da expressão das mesmas pode estar diretamente relacionada com as características migração e invasão adquiridas pelas células endometrióticas, Patten et al (2010) sugerem que as alterações na expressão da n-caderina encontradas no estudo desempenham um papel relevante na invasibilidade das lesões de endometriose e possivelmente na evolução para a malignidade.

Partindo da premissa de que a diminuição da expressão da e-caderina seja uma das principais evidências da ocorrência da TEM, Yoshida et al (2012) investigaram a associação entre polimorfismos do gene da e-caderina e endometriose na população japonesa. Este estudo consistiu na análise de 12 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), entre eles 7 do gene da e-caderina, 1 relacionado com a endometriose, 1 associado com a regulação do gene da e-caderina, 1 associado com o câncer de próstata e 2 polimorfismos de nucleotídeo único não-codificantes através da extração de DNA de sangue periférico de 511 pacientes com endometriose e 498 controles. Estes autores encontraram uma diferença na frequência de um alelo em pacientes com endometriose quando comparadas às controles, indicando que fatores genéticos podem estar envolvidos com o risco de desenvolvimento da doença e relacionando esta doença com

uma alteração no gene da e-caderina, um importante fator associado ao processo da TEM (Yoshida et al, 2012).

Matsuzaki e Darcha (2012) avaliaram o envolvimento dos processos de TEM e TME na patogênese da endometriose, em lesões de endometriose peritoneal, ovariana e profunda diferenciando-as em lesões brancas, vermelhas e negras. De acordo com estes autores, como o tecido endometrial tem sua origem na mesoderme intermediária e se transforma, supostamente pelo processo TME, durante o desenvolvimento do sistema urogenital, estas células poderiam conservar algumas das características de sua origem mesenquimal e serem predispostas a retornar as suas características originais através da TEM (Matsuzaki; Darcha, 2012).

Analisando os marcadores citoqueratina, e-caderina, n-caderina, vimentina, S100A4, beta-catenina e PAX8 por imunoistoquímica em 68 amostras de endometriose profunda, 55 de endometriose ovariana, 76 de endometriose peritoneal, 18 amostras de endométrio tópico de mulheres com endometriose, 14 de endométrio tópico de mulheres sem endometriose, 43 amostras de outros cistos ovarianos e 13 amostras de endometriose de cicatriz abdominal resultantes de cesariana, Matsuzaki e Darcha (2012) encontraram uma diminuição significativa na expressão de citoqueratina em lesões vermelhas, um aumento de e-caderina em lesões peritoneais negras e profundas, e uma expressão aumentada da proteína beta-catenina em lesões profundas, e um aumento na expressão de vimentina nas lesões peritoneais e profundas em comparação com o endométrio tópico e com as lesões ovarianas. Resultados estes que sugerem que a TEM e a TME estejam envolvidas na origem da doença (Matsuzaki; Darcha, 2012). Entretanto, este estudo não realizou a comparação das doenças em uma mesma paciente, não avaliou separadamente os dois componentes celulares da doença, epitélio e estroma.

Considerando-se a importância que o processo da TEM vem mostrando na patogênese de diversas doenças e o seu envolvimento em diversos processos biológicos, aliado à aparente semelhança das características celulares deste processo com as observadas na endometriose, o pequeno número de estudos relacionando esses tópicos e na importância da endometriose infiltrativa como forma mais severa da doença, propõe-se que a TEM esteja envolvida na etiopatogenia e desenvolvimento dessa doença. O desenvolvimento deste estudo pode contribuir para elucidar os mecanismos envolvidos no estabelecimento da endometriose, acrescentando informações ao processo

etiopatogênico, ainda pouco elucidado, podendo permitir o desenvolvimento de novas estratégias para o diagnóstico precoce e tratamento desta doença.

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral:

Avaliação dos marcadores relacionados à transição epitélio-mesênquima (TEM) (e-caderina, n-caderina, beta-catenina) e dos receptores hormonais (estrogênio e progesterona) na endometriose pélvica.

2. Objetivos Específicos:

- 1) Comparar a expressão proteica dos marcadores da TEM e dos receptores hormonais entre a endometriose superficial, ovariana e intestinal nas pacientes acometidas com os três tipos de doença concomitantemente.
- 2) Comparar a expressão proteica dos marcadores da TEM e dos receptores hormonais entre a endometriose ovariana e intestinal nas pacientes acometidas com um dos tipos de doença independentemente.
- 3) Avaliar a expressão proteica dos marcadores da TEM e dos receptores hormonais nas células epiteliais e nas células estromais dos focos de endometriose.
- 4) Correlacionar a expressão dos marcadores da TEM e dos receptores hormonais em cada um dos grupos de pacientes com:
 - a fase do ciclo menstrual;
 - a classificação histológica da endometriose.
- 5) Correlacionar a expressão dos marcadores da TEM com a expressão dos receptores de estrogênio e progesterona.

PACIENTES E MÉTODOS

1. Local do estudo e casuística

Este estudo foi realizado no Setor de Endometriose da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As pacientes propostas foram selecionadas retrospectivamente e consecutivamente entre 2008 e 2013, e constituíram dois grupos de estudo: 18 mulheres com endometriose peritoneal, ovariana e intestinal concomitantes, e 85 mulheres com endometriose ovariana e/ou profunda, dividido em 44 mulheres com endometriose ovariana e 41 com endometriose intestinal, sendo os três grupos de pacientes independentes entre si, ou seja, não existem pacientes em comum entre eles. O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e aprovado sob nº 0547/11 (anexo A). Todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), autorizando a inclusão das amostras ao estudo. (anexo B).

2. Critérios de inclusão

As pacientes foram selecionadas segundo os seguintes critérios:

- mulheres entre 18 e 45 anos, em idade fértil, com períodos menstruais eumenorréicos, com intervalo entre os ciclos variando de 26-34 dias;
- ausência de câncer e de doenças auto-imunes, confirmada por anamnese, exame físico e por exames laboratoriais quando necessário;
- não utilização de terapêutica hormonal (análogos do GnRH, progestagênios e contraceptivos hormonais) nos últimos três meses que antecederam a coleta das amostras.
- mulheres que apresentaram concomitantemente os três tipos de doença: endometriose peritoneal, ovariana e profunda comprovadas histologicamente, para o grupo 1.
- mulheres que apresentaram doença ovariana, e/ou intestinal comprovadas histologicamente, independentemente, para os grupos 2A e 2B respectivamente.

Os dados provenientes das pacientes portadoras de endometriose foram considerados após exame histológico (estadiamento, local e classificação histológica) das lesões de endometriose.

A história clínica das pacientes e as características intra-operatórias da doença foram transcritas em formulário específico e tabulados para uso posterior na análise dos resultados.

3. Número de Pacientes

Considerando-se os critérios de inclusão acima descritos, o número de pacientes foi obtido por amostra de conveniência, pelo fato de que a presença dos três locais de doença concomitantes na mesma paciente não é frequente. Além disso, muitas pacientes não preenchiam os critérios de inclusão em relação ao uso de medicações hormonais, que são utilizados como parte do tratamento da doença.

Com isso, de 609 pacientes submetidas à cirurgia de 2008 à 2013, disponíveis para estudo, foram selecionadas as pacientes que se enquadravam nos critérios de inclusão, resultando em: amostras de endometriose peritoneal, ovariana e intestinal provenientes de 18 pacientes com os três tipos da doença concomitantemente, e amostras de endometriose ovariana e intestinal provenientes de 85 pacientes consecutivas que não possuíam as três doenças concomitantes, sendo 44 amostras de lesão de ovário e 41 amostras de lesão de intestino, de modo que os três grupos são independentes entre si.

Grupo 1:

- 18 amostras de endometriose peritônio (superficial)
- 18 amostras de endometriose ovariana
- 18 amostras de endometriose intestinal (profunda)

Grupo 2A:

- 44 amostras de endometriose ovariana

Grupo 2B:

- 41 amostras de endometriose intestinal (profunda)

Todos os tecidos coletados foram processados e armazenados em blocos de parafina para posterior análise histológica e imuno-histoquímica.

4. Dinâmica do estudo

As pacientes com suspeita de endometriose foram avaliadas pelos sintomas clínicos, por exames laboratoriais e de imagem (ultrassonografia pélvica transvaginal e ressonância magnética, quando apropriado), fazendo parte do estudo aquelas que tiveram indicação de cirurgia para tratamento da doença.

Momentos antes da cirurgia, as informações da idade, raça, número de gestações, índice de massa corpórea e dia do ciclo menstrual foram adquiridas. As fases do ciclo menstrual foram consideradas como: menstrual do 1 ao 4 dia do ciclo, proliferativa do 5 ao 14, e secretória do 15 ao fim do ciclo.

Para atingir o objetivo deste estudo, os locais de doença: peritoneal (superficial), ovariana e intestinal (profunda), para o Grupo 1, ovariana para o Grupo 2A e intestinal (profunda) para o Grupo 2B, foram considerados para análise dos marcadores proteicos para a avaliação da TEM na endometriose (figura 3).

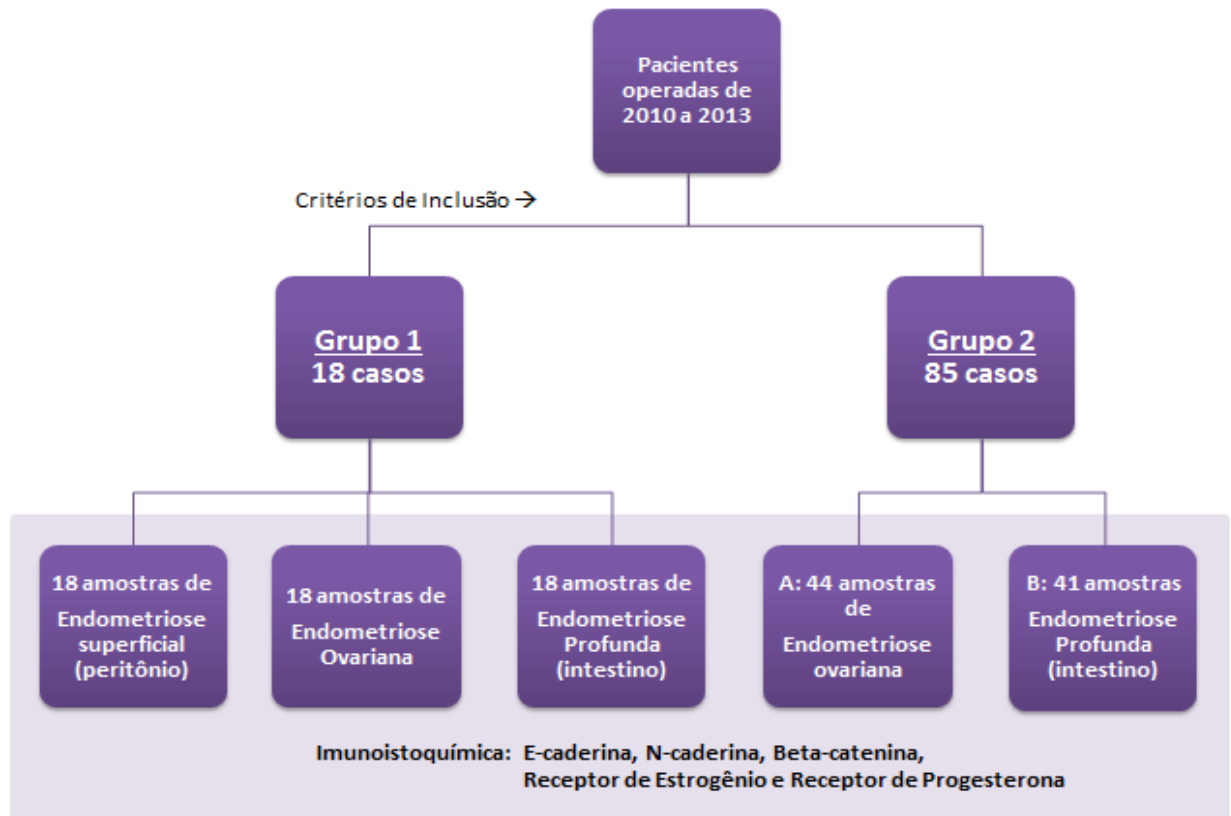


Figura 3 - Representação esquemática da dinâmica do estudo.

4.1 Quadro Clínico

As pacientes incluídas no estudo foram questionadas quanto à existência dos sintomas comumente associados à endometriose, são eles:

- Dismenorréia: dor em cólica durante o período menstrual, de acordo com a classificação:
 - Leve, quando a paciente referiu dor que melhora sem utilização de medicação analgésica;
 - Moderada, quando a paciente referiu dor que melhora com uso de analgésicos;
 - Severa, quando a paciente referiu que a dor não melhora completamente com analgésicos, mas não a impede de exercer suas atividades habituais;

- Incapacitante, quando a paciente referiu que a dor não melhora e a impede de exercer suas atividades habituais (Eskenazi et al. 2001).
- Dispareunia de profundidade: dor pélvica durante a relação sexual.
- Dor pélvica crônica: dor pélvica sem relação com o ciclo menstrual por pelo menos seis meses, sem melhora com a utilização de analgésicos.
- Alterações intestinais cíclicas: sintomas intestinais durante o período menstrual incluindo aceleração ou diminuição do trânsito intestinal, dor à evacuação, puxo, tenesmo e sangramento nas fezes.
- Alterações urinárias cíclicas: sintomas urinários durante o período menstrual incluindo disúria, hematúria, polaciúria e urgência miccional.
- Infertilidade: tentativa de engravidar em casal possuindo vida sexual ativa (2 ou mais relações por semana) sem utilizar método contraceptivo por pelo menos um ano de tentativa. Sendo considerada infertilidade primária quando a mulher nunca engravidou, e secundária quando já possui um filho ou mais.

As pacientes avaliaram a intensidade de seus sintomas de acordo com uma escala analógica de dor (anexo C).

4.2 Estadiamento

Durante o procedimento cirúrgico, a doença de cada paciente foi classificada pelos critérios estabelecidos pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) (1996), em estádios de I a IV (figura 4).

Figura 4 - Classificação da endometriose proposta pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) (revisada em 1996).

Estádio I (mínima):		1-5	Estádio III (moderada):		16-40
Estádio II (leve):		6-15	Estádio IV (severa):		> 40
ENDOMETRIOSE		< 1 cm	1 - 3 cm	> 3 cm	
Peritônio	SUPERFICIAL	1	2	4	
	PROFUNDA	2	4	6	
OVÁRIO	D	SUPERFICIAL	1	2	4
		PROFUNDA	4	16	20
	E	SUPERFICIAL	1	2	4
		PROFUNDA	4	16	20
OBLITERAÇÃO DO FUNDO DE SACO POSTERIOR		PARCIAL		COMPLETA	
		4		40	
ADERÊNCIAS		< 1/3	1/3 - 2/3	>2/3	
		Envolvido	Envolvidos	Envolvidos	
OVÁRIO	D	MEMBRANOSA	1	2	4
		DENSA	4	8	16
	E	MEMBRANOSA	1	2	4
		DENSA	4	8	16
TROMPA	D	MEMBRANOSA	1	2	4
		DENSA	4*	8*	16
	E	MEMBRANOSA	1	2	4
		DENSA	4*	8*	16

*Se as fimbrias tubárias estiverem totalmente envolvidas por aderências, muda o escore para 16.

Endometriose Adicional: _____

Patologias Associadas: _____

4.3 Locais de doença e Classificação histológica

As pacientes com endometriose foram avaliadas quanto à presença de focos de doença em peritônio, ovário e/ou profunda (intestinal), e a análise histológica dos tecidos utilizados seguiram os padrões da classificação proposta por Abrão et al. (2003), que divide a doença em dois componentes, estromal e glandular, e classifica o tecido glandular em bem diferenciado, indiferenciado e misto, de acordo com as especificações abaixo:

- Componente estromal: presença de estroma morfológicamente similar ao do endométrio tópico em qualquer fase do ciclo;
- Componente glandular bem diferenciado: presença de células epiteliais com morfologia indistinguível dos endométrios tópicos nas diferentes fases do ciclo menstrual. Estas células se apresentam em arranjos superficiais ou constituindo espaços glandulares ou císticos;
- Componente glandular indiferenciado: presença de epitélio em diferentes arranjos, sem as características morfológicas vistas no epitélio endometrial tópico;
- Componente glandular misto: presença de epitélios de padrão bem diferenciado e indiferenciado na mesma localização.

5. Método laboratorial: Imunoistoquímica

Este processo permite uma compreensão da presença, distribuição e localização de proteínas em células de diferentes tipos de tecidos biológicos, através do princípio da ligação específica de antígenos (proteínas) e anticorpos (Ramos et al, 2005).

5.1 Anticorpos

Os anticorpos selecionados para a avaliação imunoistoquímica da TEM estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Características dos anticorpos avaliados

Anticorpos	Clones	Fabricante
Receptor de estrogênio	1D5	DAKO
Receptor de progesterona	Pgr636	DAKO
Beta-catenina	Beta-catenin-1	DAKO
N-caderina	6G11	DAKO
E-caderina	NCH-38	DAKO

Para análise do processo de transição epitélio-mesênquima na endometriose foram avaliadas as expressões das moléculas relacionadas à adesão celular: n-caderina, e-caderina e beta-catenina. Além das moléculas de adesão, foram avaliadas as expressões dos receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PR), sendo o anticorpo para o receptor de estrogênio com especificidade para o ER-alfa, e o receptor de progesterona tanto para PR-A quanto para o PR-B.

Devido às diferentes características entre o tecido estromal e o tecido epitelial contidos nas lesões o que decorre em diferentes expressões dos marcadores, e dos papéis diferenciados que estes componentes podem desempenhar na origem e progressão da doença, esses componentes celulares foram analisados separadamente.

O painel imunistoquímico foi analisado em microscópio óptico considerando a presença ou ausência de marcação. No caso da presença de marcação, verificando a porcentagem de células marcadas, o padrão de distribuição, e a localização celular (núcleo, citoplasma e membrana). Foram utilizados controles positivos e negativos adequados para cada anticorpo.

A expressão dos marcadores foi representada em porcentagens de células coradas e posteriormente categorizada para a realização da análise estatística, da seguinte forma:

- 0 (sem marcação)
- 1 a 10% de marcação
- 11 a 50% de marcação
- 51 a 80% de marcação
- mais que 80% de marcação.

5.2 Reações

Os blocos de parafina dos tecidos de interesse das pacientes selecionadas foram localizados, separados, e submetidos à cortes de 3-5 μ m de espessura que foram estendidos e colados em lâminas de vidro previamente limpas. Para a seleção e identificação das áreas de interesse dos blocos de parafina, foi realizada uma análise das lâminas coradas com HE (Hematoxilina/Eosina), utilizando-se uma caneta marcadora.

A seguir, foram realizadas reações de imunistoquímica conforme técnica descrita abaixo:

- Desparafinização das lâminas deixadas por 24 horas em estufa 60oC:

Xilol a 60°C por 20 minutos

Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos

Etanol 100% 30 segundos

Etanol 85% 30 segundos

Etanol 70% 30 segundos

- Lavar as lâminas em água corrente e destilada

- Ferver a solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 em panela de pressão (Eterna®, Nigro) destampada, mergulhar as lâminas e lacrar a panela com a válvula de segurança aberta. Após a saída do vapor saturado, abaixar a válvula de segurança e aguardar a pressurização total. Cronometrar 4 minutos após esse sinal. Deixar a panela fechada sob água corrente até a despressurização total.

- Destampar a panela com as lâminas e lavar em água corrente e destilada

- Proceder ao bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3%, (água oxigenada 10 vol) com 3 trocas de 10 minutos cada. Lavar em água corrente e destilada e com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7.4 por 5 minutos.

- Incubar as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido, em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN₃) 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

- Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

- Incubar por 30 min a 37° C com Polímero MACH-4™, marca Bio care

- Lavar com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada.

- Incubar com o Polímero MACH-4™ por 30 min a 37° C

- Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

- Incubar as lâminas em solução substrato: 100 mg% de 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H₂O₂ 6% (água oxigenada 20 vol); 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

- Observar ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação.

- Lavar em água corrente e água destilada por 3 minutos.

- Contracorar com Hematoxilina de Harris por 1 minuto.

- Lavar bem em água corrente e destilada

- Imergir 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada.

- Desidratar as lâminas em:

Etanol 80%, 30 segundos

Etanol 95%, 30 segundos

Etanol 100% 2 vezes, 30 segundos cada

Xilol 4 vezes, 30 segundos cada

- Montagem das lâminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha).

6. Análise Estatística

Foram criadas categorias dos percentuais dos marcadores e usados os valores percentuais observados para comparação dos marcadores entre os locais da endometriose, entre estroma e epitélio e entre os grupos ovário e intestino. As comparações dos marcadores entre os locais da endometriose foram realizadas com uso de testes de Friedman (Kirkwood; Sterne, 2006). Entre estroma e epitélio foi utilizado teste Wilcoxon pareado separadamente em cada grupo de pacientes e entre os grupos ovário e intestino foi utilizado o teste Mann-Whitney (Kirkwood; Sterne, 2006).

Para verificar se havia relação entre os marcadores da TEM com as características fase do ciclo menstrual e classificação histológica da doença, e entre os marcadores da TEM e os receptores hormonais, foram calculadas as correlações de Spearman (Kirkwood; Sterne, 2006) e comparados entre as categorias com uso de testes Mann-Whitney (Kirkwood; Sterne, 2006) para apenas duas categorias ou testes Kruskal-Wallis (Kirkwood; Sterne, 2006) para mais de duas categorias.

Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

A avaliação das pacientes foi realizada de acordo com o grupo a que faziam parte e os resultados comparados entre si quando apropriado, sendo o Grupo 1 constituído por 18 pacientes com os três tipos de doença concomitantes, o Grupo 2A por pacientes com endometriose ovariana e o Grupo 2B por pacientes com endometriose intestinal.

As pacientes apresentaram média etária de 32, 34 e 35 anos para as pacientes do grupo 1, 2A e 2B respectivamente, e índice de massa corpórea de 22 para o grupo 1 e 23 para os grupos 2A e 2B. A maioria das pacientes apresentaram os graus mais avançados para o estadiamento da endometriose, III e IV, correspondendo a 89% das pacientes no grupo 1, 95% no grupo 2A e 68% no grupo 2B (Tabela 2).

Tabela 2 – Descrição da idade, paridade, IMC, estágio, sintomas e infertilidade das pacientes de acordo com os três grupos de estudo.

Características	Grupo 1		Grupo 2A		Grupo 2B	
	n	%	n	%	n	%
Numero de casos	18		44		41	
Idade*	32 (21 - 40)		34 (21 - 45)		35 (24 - 45)	
Paridade*	0 (0 - 2)		0 (0 - 2)		0 (0 - 4)	
IMC*	22 (18,6 - 27,6)		23 (16,8 - 35,3)		23 (17,2 - 34,5)	
Estádio**						
I e II	2	11	2	5	13	32
III e IV	16	89	42	95	28	68
Sintomas Clínicos - EAD						
Dismenorreia	18	100	40	91	40	98
Dor acíclica	9	50	18	41	18	44
Dispareunia	14	78	23	52	24	59
Disquezia	7	39	8	18	21	51
Disuria	1	6	3	7	4	10
Infertilidade	8	44	18	41	18	44

* Média

**Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM)

IMC: Índice de Massa Corpórea (peso/altura²)

EAD: Escala analógica de dor

Infertilidade: mulher que não está conseguindo ter filhos há 1 ano ou mais

Grupo 1: mulheres com endometriose peritoneal, ovariana e intestinal concomitantes

Grupo 2A: mulheres com endometriose ovariana

Grupo 2B: mulheres com endometriose intestinal

Os dados clínicos completos das pacientes participantes do estudo utilizados nas análises, encontram-se nos anexos D e E para o grupo 1, F e G para o grupo 2A e H e I para o grupo 2B.

A expressão proteica dos marcadores relacionados à transição epitélio-mesênquima: e-caderina, n-caderina, beta-catenina, e dos receptores de estrogênio e de progesterona foram avaliados nos locais de doença de interesse correspondentes a cada grupo de estudo e em cada um dos componentes celulares das lesões de endometriose, epitélio e estroma. As moléculas de adesão e-caderina, n-caderina e beta-catenina mostraram-se expressas na membrana das células epiteliais e/ou estromais, e os receptores de estrogênio e progesterona demonstraram expressão nuclear no epitélio e no estroma das lesões de endometriose.

A avaliação da expressão dos marcadores de acordo com a fase do ciclo das pacientes no momento da cirurgia esta representada na tabela 3 para o grupo 1, na tabela 4 para o grupo 2A e na tabela 5 para o grupo 2B.

Tabela 3 - Avaliação das medianas da fase do ciclo menstrual nas pacientes com endometriose peritoneal, ovariana e intestinal concomitantes (grupo 1).

Local	Marcador	Fase do ciclo			p	
		Menstrual	Proliferativa	Secretora		
		Mediana	Mediana	Mediana		
Peritônio	Epitélio	N-caderina	40	50	0	0,350
		E-caderina	100	100	100	>0,999
		Beta-catenina	100	100	100	>0,999
	Estroma	Receptor de Estrogênio	70	95	100	0,289
		Receptor de Progesterona	100	100	100	0,616
		N-caderina	20	0	0	0,636
		E-caderina	0	0	0	>0,999
		Beta-catenina	80	60	50	0,537
		Receptor de Estrogênio	90	100	100	0,701
Ovário	Epitélio	N-caderina	100	50	0	0,580
		E-caderina	100	100	100	>0,999
		Beta-catenina	100	100	100	>0,999
	Estroma	Receptor de Estrogênio	80	90	75	0,210
		Receptor de Progesterona	20	80	40	0,496
		N-caderina	0	0	0	0,834
		E-caderina	0	0	0	>0,999
		Beta-catenina	70	55	60	0,539
		Receptor de Estrogênio	100	100	100	>0,999
Intestino	Epitélio	N-caderina	0	0	0	0,459
		E-caderina	100	100	100	>0,999
		Beta-catenina	100	100	100	>0,999
	Estroma	Receptor de Estrogênio	80	100	100	0,281
		Receptor de Progesterona	100	100	100	0,779
		N-caderina	100	0	0	0,274
		E-caderina	0	0	0	>0,999
		Beta-catenina	50	80	75	0,545
		Receptor de Estrogênio	100	100	100	>0,999

Fase menstrual: 1° ao 4° dia do ciclo

Fase proliferativa: 5° ao 14° dia do ciclo

Fase secretora: 15° ao fim do ciclo

Como pode ser observado na tabela 3 não houve influência da fase do ciclo menstrual na expressão dos marcadores no grupo de estudo 1.

Tabela 4 - Avaliação das medianas da fase do ciclo menstrual nas pacientes com endometriose ovariana (grupo 2A).

Local	Marcador	Fase do ciclo			p	
		Menstrual	Proliferativa	Secretora		
		Mediana	Mediana	Mediana		
Ovário	Epitélio	N-caderina	100	0	50	0,279
		E-caderina	100	100	100	>0,999
		Beta-catenina	100	100	100	>0,999
		Receptor de Estrogênio	100	90	90	0,436
		Receptor de Progesterona	100	60	45	0,364
	Estroma	N-caderina	70	0	0	0,144
		E-caderina	0	0	0	>0,999
		Beta-catenina	90	50	70	0,230
		Receptor de Estrogênio	100	100	100	0,959

Fase menstrual: 1° ao 4° dia do ciclo

Fase proliferativa: 5° ao 14° dia do ciclo

Fase secretora: 15° ao fim do ciclo

Tabela 5 - Avaliação das medianas da fase do ciclo menstrual nas pacientes com endometriose intestinal (grupo 2B).

Local	Marcador	Fase do ciclo			p	
		Menstrual	Proliferativa	Secretora		
		Mediana	Mediana	Mediana		
Intestino	Epitélio	N-caderina	100	0	0	0,262
		E-caderina	100	100	100	>0,999
		Beta-catenina	100	100	100	>0,999
		Receptor de Estrogênio	100	100	100	0,272
		Receptor de Progesterona	100	100	100	0,747
	Estroma	N-caderina	0	0	0	0,724
		E-caderina	0	0	0	0,351
		Beta-catenina	80	80	55	0,239
		Receptor de Estrogênio	100	100	100	0,325

Fase menstrual: 1° ao 4° dia do ciclo

Fase proliferativa: 5° ao 14° dia do ciclo

Fase secretora: 15° ao fim do ciclo

Assim como no grupo 1, as tabelas 4 e 5 ilustram que a avaliação da fase do ciclo em relação aos marcadores nos grupos 2A e 2B, endometriose ovariana e intestinal independentes, não apresentou diferenças significativas.

A expressão dos marcadores representada em porcentagens foi subsequentemente categorizada para melhor análise e com o objetivo de avaliar se existem diferenças entre as células que constituem o tecido endometrial, epiteliais e estromais, e se existem

diferenças entre os três tipos de doença, superficial, ovariana e profunda, quanto à expressão das proteínas estudadas, realizou-se uma série de comparações dos resultados das marcações entre os componentes citados (tabelas 6 a 9).

A Tabela 6 ilustra os resultados correspondentes à expressão proteica das moléculas de adesão n-caderina, e-caderina e beta-catenina para o grupo de estudo de pacientes com as três doenças concomitantes (peritoneal, ovariana e intestinal).

Tabela 6 - Comparação da expressão proteica da n-caderina, e-caderina e beta-catenina nos diferentes sítios de doença e no epitélio e estroma nas pacientes do grupo 1 (endometriose peritoneal, ovariana e intestinal concomitantes).

Variável	Peritônio		Ovário		Intestino		p
	n	%	n	%	n	%	
Epitélio N-Caderina							0,446
0	7	58,3	8	47,1	14	77,8	
1 a 10	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
11 a 50	3	25,0	1	5,9	0	0,0	
51 a 80	0	0,0	0	0,0	1	5,6	
> 80	2	16,7	8	47,1	3	16,7	
Estroma N-Caderina							0,032
0	7	58,3	16	94,1	12	66,7	
1 a 10	1	8,3	0	0,0	0	0,0	
11 a 50	4	33,3	0	0,0	2	11,1	
51 a 80	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
> 80	0	0,0	1	5,9	4	22,2	
p*	0,222		0,007		0,662		
Epitélio E-Caderina							&
0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
1 a 10	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
11 a 50	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
51 a 80	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
> 80	17	100,0	16	100,0	17	100,0	
p*	&		&		&		
Epitélio Beta-catenina							&
0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
1 a 10	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
11 a 50	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
51 a 80	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
> 80	18	100,0	16	100,0	17	100,0	
p*	&		&		&		

& Não foi possível calcular

Conforme está demonstrado na Tabela 6, a comparação das marcações entre os locais de doença, peritoneal, ovariana e profunda foi significativamente diferente quanto à n-caderina, que se mostrou menor no estroma do ovário que no estroma do intestino e

do peritônio ($p=0,032$). Ainda de acordo com a Tabela 6, as comparações entre as células epiteliais e as células estromais apresentaram diferenças significativas: na expressão da n-caderina, que se mostrou maior no epitélio que no estroma das lesões de ovário ($p=0,007$).

Análises da expressão da e-caderina e da beta-catenina entre o epitélio e o estroma não puderam ser consideradas, pois estes marcadores apresentaram cem por cento de expressão no epitélio dos três tipos de lesão e não foi avaliável no estroma, pois foi observado ausência de marcação. Pelo mesmo motivo, as análises comparativas entre os locais de lesão não foram possíveis de serem avaliadas para estes marcadores.

Os resultados para as expressões de n-caderina, e-caderina e beta-catenina no epitélio e estroma e as comparações entre as lesões de ovário e intestino, nas pacientes com endometriose ovariana e intestinal independentes, estão representadas na tabela 7 correspondendo às análises dos grupos 2A e 2B.

Pode ser observado que a comparação entre as lesões ovarianas e intestinais demonstrou que a expressão da n-caderina foi maior no epitélio do ovário do que no epitélio do intestino ($p=0,020$) e que a comparação entre as células epiteliais e as células estromais, mostrou que esta mesma molécula apresentou maior expressão no epitélio em comparação ao estroma nas lesões de ovário ($p<0,001$), e nas de intestino ($p=0,041$) (tabela 7). Da mesma forma que ocorreu no grupo 1, as moléculas de adesão e-caderina e beta-catenina, apresentaram cem por cento de marcação no epitélio das lesões ovariana e intestinal, e ausência de marcação no estroma destes tecidos, impossibilitando as análises comparativas entre os componentes celulares e entre os dois tipos de lesão.

Tabela 7 - Comparação da expressão proteica da n-caderina, e-caderina e beta-catenina nos diferentes sítios de doença e no epitélio e estroma nas pacientes dos grupos 2A e 2B (endometriose ovariana e intestinal independentes).

Variável	Ovário		Intestino		p
	n	%	n	%	
Epitélio N-Caderina					0,020
0	17	44,7	26	66,7	
1 a 10	0	0,0	1	2,6	
11 a 50	4	10,5	4	10,3	
51 a 80	1	2,6	2	5,1	
> 80	16	42,1	6	15,4	
Estroma N-Caderina					0,692
0	35	89,7	34	87,2	
1 a 10	1	2,6	0	0,0	
11 a 50	1	2,6	2	5,1	
51 a 80	1	2,6	1	2,6	
> 80	1	2,6	2	5,1	
p*	<0,001		0,041		
Epitélio E-Caderina					&
0	0	0,0	0	0,0	
1 a 10	0	0,0	0	0,0	
11 a 50	0	0,0	0	0,0	
51 a 80	0	0,0	0	0,0	
> 80	42	100,0	40	100,0	
p*	&		&		
Epitélio Beta-catenina					&
0	0	0,0	0	0,0	
1 a 10	0	0,0	0	0,0	
11 a 50	0	0,0	0	0,0	
51 a 80	0	0,0	0	0,0	
> 80	42	100,0	38	100,0	
p*	&		&		

& Não foi possível calcular

Foram realizadas as mesmas análises para a expressão dos receptores de estrogênio e progesterona, ilustrados nas tabelas 8 para o grupo 1, e tabela 9 para os grupos 2A e 2B.

Tabela 8 - Comparação da expressão proteica dos receptores de estrogênio e progesterona nos diferentes sítios de doença e no epitélio e estroma nas pacientes do grupo 1 (endometriose peritoneal, ovariana e intestinal concomitantes).

Variável	Peritônio		Ovário		Intestino		p
	n	%	n	%	n	%	
Epitélio Receptor de Estrogênio							0,048
0	2	11,1	1	6,3	0	0,0	
1 a 10	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
11 a 50	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
51 a 80	2	11,1	9	56,3	3	18,8	
> 80	14	77,8	6	37,5	13	81,3	
Estroma Receptor de Estrogênio							0,488
0	2	12,5	1	6,3	0	0,0	
1 a 10	1	6,3	1	6,3	0	0,0	
11 a 50	6	37,5	3	18,8	6	37,5	
51 a 80	5	31,3	11	68,8	6	37,5	
> 80	2	12,5	0	0,0	4	25,0	
p*	<0,001		0,091		0,004		
Epitélio Receptor de Progesterona							0,002
0	0	0,0	1	7,1	0	0,0	
1 a 10	0	0,0	2	14,3	0	0,0	
11 a 50	1	5,6	6	42,9	1	5,9	
51 a 80	0	0,0	1	7,1	0	0,0	
> 80	17	94,4	4	28,6	16	94,1	
Estroma Receptor de Progesterona							0,018
0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
1 a 10	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
11 a 50	1	5,6	0	0,0	0	0,0	
51 a 80	3	16,7	0	0,0	0	0,0	
> 80	14	77,8	16	100,0	17	100,0	
p*	0,257		0,004		0,317		

No grupo 1, em que as pacientes possuíam os três tipos de doença concomitantes, quando se comparou a expressão dos receptores no epitélio entre os locais de lesão, observa-se que expressão do receptor de estrogênio foi maior no epitélio do intestino e do peritônio do que no epitélio do ovário ($p=0,048$), assim como a expressão do receptor de progesterona se mostrou maior no peritônio e intestino quando comparado ao ovário ($p=0,002$) (tabela 8). Quando analisado o estroma, o receptor de estrogênio não mostrou diferença significativa, mas o receptor de progesterona se mostrou menor no estroma do peritônio do que no ovário e intestino ($p=0,018$) (tabela 8).

Já na comparação entre os componentes epitélio e estroma, não houve diferenças significativas no ovário para o receptor de estrogênio, mas houve no peritônio e no

intestino, em que a expressão se revelou maior no epitélio do que no estroma nos dois tipos de lesão ($p < 0,001$, $p = 0,004$) (tabela 8). O receptor de progesterona não se mostrou diferentemente expresso entre epitélio e estroma no peritônio e intestino, somente no ovário, em que se revelou maior no estroma do que no epitélio ($p = 0,004$) (tabela 8).

Tabela 9 - Comparação da expressão proteica dos receptores de estrogênio e progesterona nos diferentes sítios de doença e no epitélio e estroma nas pacientes dos grupos 2A e 2B (endometriose ovariana e intestinal independentes).

Variável	Ovário		Intestino		p
	n	%	n	%	
Epitélio Receptor de Estrogênio					0,146
0	4	12,5	1	2,7	
1 a 10	0	0,0	1	2,7	
11 a 50	4	12,5	1	2,7	
51 a 80	5	15,6	7	18,9	
> 80	19	59,4	27	73,0	
Estroma Receptor de Estrogênio					0,269
0	6	16,7	4	11,1	
1 a 10	1	2,8	1	2,8	
11 a 50	10	27,8	9	25,0	
51 a 80	15	41,7	14	38,9	
> 80	4	11,1	8	22,2	
p*	<0,001		<0,001		
Epitélio Receptor de Progesterona					<0,001
0	4	11,4	0	0,0	
1 a 10	6	17,1	0	0,0	
11 a 50	9	25,7	1	2,6	
51 a 80	3	8,6	0	0,0	
> 80	13	37,1	38	97,4	
Estroma Receptor de Progesterona					0,901
0	1	2,3	0	0,0	
1 a 10	0	0,0	0	0,0	
11 a 50	0	0,0	0	0,0	
51 a 80	1	2,3	2	5,3	
> 80	42	95,5	36	94,7	
p*	<0,001		>0,999		

Para os grupos 2A e 2B, as comparações da expressão do receptor de estrogênio entre as lesões de ovário e intestino não mostraram diferenças significativas no epitélio ou no estroma ($p = 0,146$, $p = 269$), mas a expressão do receptor de progesterona

mostrou-se maior no epitélio do intestino do que no do ovário ($p<0,001$), e não mostrou diferença no estroma ($p=0,901$) (tabela 9).

Ainda em relação aos grupos 2A e 2B, a tabela 9 ilustra que o receptor de estrogênio se mostrou mais expresso no epitélio do que no estroma tanto nas lesões de ovário como nas lesões de intestino ($p<0,001$, $p<0,001$), e ao contrário, o receptor de progesterona se revelou mais expresso no estroma do que no epitélio do ovário ($p<0,001$), mas não mostrou diferença no intestino ($p>0,999$).

Além das análises acima representadas, correlacionou-se a expressão proteica dos marcadores selecionados com a classificação histológica da endometriose sugerida por Abrão et al (2003), com o estadiamento de acordo com a ASRM (1996), e com os sintomas clínicos das pacientes de acordo com uma escala analógica de dor, de modo que os dois últimos fatores não demonstraram resultados relevantes ao estudo.

Com relação à classificação histológica da endometriose nos locais de doença estudados, a tabela 10 demonstra que no grupo 1 não houve relação com a expressão dos marcadores estudados.

Tabela 10 - Avaliação das medianas da expressão proteica dos marcadores de acordo com a classificação histológica da endometriose nas pacientes com endometriose peritoneal, ovariana e intestinal concomitantes (grupo 1).

Local	Marcador	E	E+I	E+M*	p	
		Mediana	Mediana	Mediana		
Peritônio	Epitélio	N-caderina	20	0	0	0,744
		E-caderina	100	100	100	>0,999
		Beta-catenina	100	100	100	>0,999
		Receptor de progesterona	100	100	95	0,632
		Receptor de estrogênio	100	100	100	0,809
Estroma		N-caderina	0	0	10	0,624
		Beta-catenina	0	0	0	>0,999
		Receptor de progesterona	80	50	60	0,335
		Receptor de estrogênio	100	90	100	0,205
Ovário	Epitélio	N-caderina		25	100	0,622
		E-caderina		100	100	>0,999
		Beta-catenina		100	100	>0,999
		Receptor de progesterona		50	20	0,175
		Receptor de estrogênio		80	80	0,824
Estroma		N-caderina		0	0	0,232
		Beta-catenina		0	0	>0,999
		Receptor de progesterona		100	100	>0,999
		Receptor de estrogênio		60	70	0,304
Intestino	Epitélio	N-caderina		0	0	0,747
		E-caderina		100	100	>0,999
		Beta-catenina		100	100	>0,999
		Receptor de progesterona		100	100	0,460
		Receptor de estrogênio		90	100	0,146
Estroma		N-caderina		0	0	0,955
		Beta-catenina		0	0	>0,999
		Receptor de progesterona		100	100	>0,999
		Receptor de estrogênio		50	80	0,061

E: estroma

E+I: estroma + epitélio indiferenciado

E+M: estroma + epitélio misto

*nenhuma paciente deste grupo apresentou doença E+BD (estroma + epitélio bem diferenciado)

Entretanto, com relação aos grupos 2A e 2B, as tabelas 11 e 12 demonstram que houveram diferenças significativas. No grupo 2A (tabela 11), a expressão da n-caderina no componente estromal do ovário mostrou-se maior na classificação E+BD (estroma + epitélio bem diferenciado) (p=0,009).

No grupo 2B (tabela 12) a expressão da n-caderina no componente estromal do intestino, foi maior na classificação E+BD (estroma + epitélio bem diferenciado)

($p=0,014$), e a expressão da beta-catenina no componente estromal do intestino, mostrou-se maior também na classificação E+BD (estroma + epitélio bem diferenciado) ($p<0,001$).

Tabela 11 - Avaliação das medianas da expressão proteica dos marcadores de acordo com a classificação histológica da endometriose nas pacientes com endometriose ovariana (grupo 2A).

Local	Marcador	E	E+BD	E+I	p	
		Mediana	Mediana	Mediana		
Ovário	Epitélio	N-caderina	40	0	35	0,753
		E-caderina	100		100	>0,999
		Beta-catenina	100		100	>0,999
		Receptor de progesterona	50	100	50	0,564
		Receptor de estrogênio			90	0,531
	Estroma	N-caderina	0	100	0	0,009
		Beta-catenina	0	0	0	>0,999
		Receptor de progesterona	100	100	100	0,798
	Receptor de estrogênio		70	60	0,195	

E: estroma

E+BD: estroma + epitélio bem diferenciado

E+I: estroma + epitélio indiferenciado

*nenhuma paciente deste grupo apresentou doença E+M (estroma + epitélio misto)

Tabela 12 - Avaliação das medianas da expressão proteica dos marcadores de acordo com a classificação histológica da endometriose nas pacientes com endometriose intestinal (grupo 2B).

Local	Marcador	E+BD	E+I	E+M	p	
		Mediana	Mediana	Mediana		
Intestino	Epitélio	N-caderina	0	0	0	0,656
		E-caderina	100	100	100	>0,999
		Beta-catenina	100	100	100	>0,999
		Receptor de progesterona	100	100	100	0,756
		Receptor de estrogênio	100	100	100	0,468
	Estroma	N-caderina	100	0	0	0,014
		Beta-catenina	50	0	0	<0,001
		Receptor de progesterona	95	100	100	0,343
	Receptor de estrogênio	85	70	70	0,356	

E+BD: estroma + epitélio bem diferenciado

E+I: estroma + epitélio indiferenciado

E+M: estroma + epitélio misto

*nenhuma paciente deste grupo apresentou doença E (estroma)

Para a análise de uma possível relação entre a expressão das proteínas relacionadas à transição epitélio-mesênquima e dos receptores dos hormônios esteroides, objetivou-se realizar uma correlação entre a expressão de cada um dos marcadores da TEM com cada um dos receptores, entretanto, conforme ilustrado na tabela 13, somente a n-caderina foi possível de ser correlacionada, pois a e-caderina e a beta-catenina não demonstraram variação de expressão. Deste modo, de acordo com a tabela 13, a expressão da n-caderina no estroma do intestino apresentou correlação direta com a expressão do receptor de estrogênio ($p=0,036$).

Tabela 13 – Correlação da expressão proteica dos marcadores da TEM (N-caderina, E-caderina e Beta-catenina) com os receptores de progesterona e de estrogênio nas pacientes com endometriose peritoneal, ovariana e intestinal concomitantes (grupo 1).

Local	Correlação		Epitélio		Estroma		
			Receptor de Progesterona	Receptor de Estrogênio	Receptor de Progesterona	Receptor de Estrogênio	
Peritônio	Epitélio	N-caderina	r	-0,488	-0,268	-0,247	0,055
			p	0,107	0,400	0,439	0,871
	Estroma	N-caderina	r	-0,439	-0,263	-0,222	0,230
			p	0,153	0,408	0,488	0,496
Ovário	Epitélio	N-caderina	r	0,009	-0,069	-0,266	-0,014
			p	0,953	0,660	0,052	0,923
	Estroma	N-caderina	r	0,277	0,192	0,076	0,267
			p	0,060	0,211	0,582	0,066
Intestino	Epitélio	N-caderina	r	-0,063	-0,051	-0,049	0,007
			p	0,646	0,723	0,723	0,963
	Estroma	N-caderina	r	-0,162	-0,011	-0,007	0,297
			p	0,238	0,937	0,958	0,036

Com a finalidade de avaliar se a expressão dos marcadores estudados é influenciada pela presença de outros locais de doença, realizou-se a avaliação dos marcadores em cada um dos sítios analisados de acordo com os outros locais de acometimento dentro de cada grupo, o que não acrescentou informações relevantes (anexos G, H, I e J). Por fim, nenhuma relação da expressão proteica dos marcadores propostos com os parâmetros clínicos das pacientes foi encontrada.

DISCUSSÃO

A endometriose é umas das principais doenças ginecológicas estudadas nas últimas décadas, pois consiste em uma das maiores causas de dor e infertilidade em mulheres em idade reprodutiva e devido aos aspectos desafiadores relacionados com a sua etiopatogenia, com a dificuldade no diagnóstico e tratamento que ainda dependem de métodos invasivos e com os fatores de risco e modos de prevenção que permanecem desconhecidos.

Apesar dos enormes esforços por parte de pesquisadores e médicos no sentido de esclarecer os aspectos obscuros da endometriose, muitas questões ainda permanecem sem resposta o que demonstra a complexidade desta doença. Apesar de ser considerada doença benigna, apresenta diversas características em comum com doenças malignas, como se apresentar como uma doença multifocal, o que sugere que as células endometriais ectópicas possuam uma capacidade de migração para dar origem aos diversos focos da doença na mesma paciente, além possuir as capacidades de proliferação, de invasão e de neoangiogênese que fazem com que as lesões se desenvolvam e sobrevivam nos diferentes tecidos (Abrão et al, 2006; Thomas; Campbell, 2000A).

A transição epitélio-mesênquima (TEM) é um processo reconhecidamente envolvido nas transformações entre células epiteliais e mesenquimais durante o desenvolvimento embrionário, mas somente nos últimos anos tem sido identificada como um fenômeno que pode estar relacionado com os processos de invasão e metástase de células malignizadas, pois é um processo que envolve mudanças celulares como a perda da adesão celular e a remodelação do citoesqueleto, conferindo à estas células habilidades migratórias e invasivas (Hay, 1995; Thiery et al., 2006; Acloque et al., 2009).

Nesse sentido, o presente estudo teve o objetivo de acrescentar informações a respeito dos processos envolvidos na origem, desenvolvimento e persistência das lesões de endometriose, para colaborar na busca de melhores formas de diagnóstico e tratamento da doença, através do estudo da expressão proteica de e-caderina, n-caderina, beta-catenina, receptor de progesterona e receptor de estrogênio em 103 casos de pacientes com endometriose, sendo 18 casos correspondentes a pacientes que possuem doença superficial, ovariana e profunda concomitantemente, o que possibilitou uma análise concreta das diferenças entre os três tipos de endometriose proposto por Nisolle e Donnez (1997).

Os casos foram divididos em dois grupos de estudo, conforme ilustrado na Tabela 2, que se mostraram homogêneos quanto à média etária, paridade e índice de massa corpórea, e semelhantes quanto ao grau de estadiamento da doença, sendo a maioria das pacientes afetadas pelos graus mais avançados da endometriose (III e IV), o que corresponde ao esperado, pois as pacientes incluídas no estudo apresentam as manifestações mais graves da doença, quando há o comprometimento do intestino e/ou do ovário.

Quanto aos sintomas, a dismenorréia se confirmou como o principal sintoma apresentando pelas pacientes, sendo relatada por mais de noventa por cento delas. A queixa de disquezia, conforme o esperado, foi maior no grupo 2B, em que as pacientes possuíam lesão intestinal, e os demais sintomas incluindo a infertilidade, manifestaram-se com frequências semelhantes nos três grupos de estudo (tabela 2) (Eskenazi et al, 2001; Wu et al, 2002; Siristatidis et al, 2006).

Uma questão importante que surge na avaliação de aspectos relacionados à endometriose, é que diversos aspectos da doença são alterados de acordo com a fase do ciclo menstrual das mulheres, uma vez que esta seja uma doença hormônio dependente, na qual as lesões são influenciadas pelo ciclo hormonal feminino de modo semelhante ao tecido endometrial normal.

Estudos sugerem que haja uma variação na expressão da n-caderina no endométrio tópico entre as fases proliferativa e secretora, o que poderia significar que a maior expressão de n-caderina na fase proliferativa auxilie a manter a integridade do endométrio para permitir a implantação do embrião, enquanto a expressão reduzida na fase secretora diminua a adesão célula-célula permitindo descamação do endométrio (menstruação) (Poncelet et al., 2002; Tsuchiya et al; 2006; Patten et al; 2010).

Deste modo, uma das preocupações neste estudo foi verificar se haveria alguma alteração na expressão proteica dos marcadores propostos nas diferentes fases do ciclo menstrual das pacientes. Conforme ilustrado nas tabelas 3, 4 e 5, a análise realizada entre a variação dos marcadores de acordo com a fase do ciclo das pacientes no momento da cirurgia não detectou nenhuma diferença significativa, o que possibilitou que as demais análises fossem realizadas independentemente do ciclo menstrual a que as pacientes se encontravam. Os dados com relação a influencia da fase do ciclo menstrual nestes marcadores ainda são contraditórios, mas diversos estudos também não encontram diferenças na expressão dessas moléculas nas lesões de endometriose, entre

eles, Poncelet et al; (2002) e Beliard et al (1997) que analisaram biópsias de endometriose peritoneal, Darai, et al; (1998) que observaram lesões císticas de endometriose de ovário e Matsuzaki e Darcha (2012) que estudaram amostras de lesões peritoneais, ovarianas e profundas.

Moléculas de adesão e endometriose

As moléculas de adesão e-caderina, n-caderina e beta-catenina têm demonstrado uma crescente relevância em diversos estudos com doenças em que células apresentam a característica de motilidade celular, como neoplasias, pois possuem um papel fundamental na manutenção da estrutura e função de tecidos normais.

Quando se trata das lesões de endometriose, é possível que alterações na expressão das moléculas de adesão possam conferir características de motilidade e invasibilidade às células endometriais, a perda da função da e-caderina e o aumento da expressão da n-caderina estão sendo relacionadas às transformações no fenótipo de células epiteliais para mesenquimais no processo da TEM (Patten et al.; 2010; Qi, et al.; 2005; Gomes et al.; 2011; Zeitvogel et al., 2001).

No presente estudo, a expressão proteica de e-caderina foi identificada na membrana das células epiteliais das lesões de endometriose, mas não foi encontrada no componente estromal dessas lesões, o que ocorreu igualmente com a molécula beta-catenina. Já a molécula de adesão n-caderina, expressou-se na membrana tanto no componente epitelial como nas células estromais, o que não é um resultado inesperado já que diversos estudos vêm identificando a expressão desta molécula em células mesenquimais (Peralta-Soler, 1997; Poncelet, 2002).

Neste estudo foi dado especial destaque às comparações entre os diferentes sítios acometidos pela endometriose concomitantemente nas mesmas pacientes (endometriose superficial, ovariana e profunda). Assim, na tabela 6 onde estão apresentadas as avaliações da expressão dos marcadores relacionados à transição epitélio-mesênquima neste grupo de pacientes, pode ser observado que a expressão proteica de n-caderina foi menor no estroma da endometriose comprometendo o ovário, em comparação às lesões intestinais e peritoneais, sugerindo que as lesões de endometriose de ovário tenham um caráter menos agressivo, já que a expressão de n-caderina tem sido vinculada à um aumento na motilidade e invasibilidade de diversos tipos de doenças malignas como no

carcinoma de mama e de próstata e no melanoma (Qi et al. 2005; Hazan et al, 2000; Tomita et al., 2000).

Tal fato pode se justificar pela morfologia das lesões ovarianas, que parecem não apresentar o mesmo potencial de invasão que as lesões presentes em outros sítios, sendo identificadas como formações císticas ou superficiais ovarianas, e não como doença infiltrativa profunda como ocorre em outros locais de doença. Estes resultados confirmam a proposta de Nisolle e Donnez (1997) de que a doença ovariana possui uma patologia diferenciada das doenças superficial e profunda, pois de acordo com estes autores, a doença ovariana cística tem origem a partir da invaginação do córtex ovariano após o acúmulo de detritos de sangramento menstrual (Nisolle e Donnez, 1997).

Estudos semelhantes que buscaram investigar o envolvimento da transição epitélio-mesênquima na endometriose, não avaliaram os componentes celulares, epitelial e estromal, separadamente. Matsuzaki e Darcha (2012) observaram expressão ausente ou escassa de n-caderina no epitélio da endometriose pélvica, e dividindo as lesões peritoneais em vermelhas e negras, identificaram uma maior expressão de n-caderina no epitélio das lesões vermelhas, sugerindo que estes tipos de lesão representem diferentes estágios da evolução da endometriose e que as lesões negras possuam uma natureza menos invasiva. Estudando amostras de endometriose gastrointestinal, Patten et al. (2010) identificaram conservação na expressão da e-caderina e da beta-catenina no epitélio das lesões, e uma diminuição na expressão da n-caderina em comparação ao endométrio tópico.

Poncelet et al. (2002), assim como o presente estudo, analisaram as células epiteliais e estromais separadamente e detectaram uma expressão constante da e-caderina no epitélio do endométrio e uma ausência de expressão nas células estromais, e em adição não identificaram relação da expressão com a fase do ciclo menstrual. Já para a n-caderina, estes mesmos autores observaram uma expressão no componente epitelial e no estromal, tanto no endométrio tópico como no ectópico, mas relacionaram uma variação na expressão desta molécula nas células estromais com a fase do ciclo menstrual, concluindo que a n-caderina é expressa na fase proliferativa das lesões, mas é ausente na fase secretora.

Neste estudo também foi avaliada a expressão proteica dos marcadores relacionados à transição epitélio-mesênquima em lesões de ovário e intestino de pacientes diferentes, e foi observado que a n-caderina foi maior no epitélio das lesões

ovarianas quando comparadas às lesões intestinais, resultado este que pode ter tido influência da avaliação ter sido realizada em pacientes diferentes, o que torna este estudo único quando se trata da análise das lesões nas mesmas pacientes.

A expressão proteica da e-caderina e da beta-catenina não se mostraram diferentemente expressas nas lesões de endometriose, nem no grupo de pacientes com os três tipos de lesões concomitantes, nem no grupo com as lesões independentes, de modo que estas moléculas apresentaram expressão constante no epitélio de todas as lesões de endometriose estudadas, e não mostraram expressão nas células estromais, resultados que estão em acordo com outros estudos semelhantes existentes na literatura, apresentando o comportamento esperado destas moléculas assim como ocorre no tecido endometrial normal (Patten et al.; 2010; Poncelet et al. 2002; Zeitvogel et al.; 2001).

Receptor de estrogênio e progesterona e endometriose

Já está bem estabelecido que a endometriose é uma doença complexa influenciada pelos hormônios estrogênio e progesterona, e que tanto os tecidos endometriais tópicos quanto ectópicos expressam os receptores destes hormônios. Entretanto, o papel que estes hormônios e seus respectivos receptores possuem na origem, desenvolvimento e manutenção da doença permanecem incertos, podendo atuar como estimuladores do crescimento dos implantes ou como fator de proteção contra a progressão da doença (Olive et al, 2001; Missmer; Cramer, 2003).

Desta forma, partindo do princípio que a transição epitélio-mesênquima pode ser mediada por diversos fatores moleculares e bioquímicos, o presente estudo buscou avaliar a ação dos hormônios esteroides através da expressão de seus receptores, sugerindo que estes hormônios possam agir como um estímulo para que as células endometriais desenvolvam as capacidades de motilidade, invasão e proliferação, características estas, relacionadas ao processo da transição epitélio mesênquima.

A comparação da expressão proteica dos receptores hormonais entre os locais de doença concomitantes nas mesmas pacientes, demonstrada na tabela 8, revelou que a endometriose ovariana apresenta uma menor expressão dos receptores de estrogênio e progesterona nas células epiteliais em comparação com doença peritoneal e intestinal, resultado que foi confirmado na análise da expressão do receptor de progesterona no

epitélio nas lesões ovarianas e intestinais de pacientes independentes, demonstrado na tabela 9.

Corroborando os resultados encontrados no presente estudo, Fujishita et al. (1997) também observaram elevada expressão de receptor de estrogênio (ER) e de progesterona (PR) nos tecidos endometriais ectópicos, tanto no epitélio como no estroma, e esta expressão também não variou de acordo com a fase do ciclo.

Em conjunto, as análises das expressões dos receptores de estrogênio e progesterona nos diferentes tipos de lesão, mostrando que os mesmos se comportam diferentemente nas lesões ovarianas, reforçam os resultados apresentados anteriormente, que demonstram a peculiaridade das lesões de endometriose que acometem o ovário.

Moléculas de adesão e Classificação Histológica da endometriose

Conforme observado na tabela 10, no grupo de estudo com as três doenças concomitantes, não foram encontradas diferenças significativas nas expressões dos marcadores relacionados à transição epitélio-mesênquima de acordo com as três classificações histológicas identificadas, sendo as classificações: ‘estromal’, ‘estromal e indiferenciada’, e ‘estromal e mista’. Entretanto, uma possível razão para isto é o fato de este grupo de pacientes não ter apresentado nenhuma doença classificada como ‘estromal e bem diferenciada’, que de acordo com Abrão et al. (2003) estaria associada ao melhor prognóstico da doença, e as pacientes incluídas neste grupo foram mulheres acometidas com as três modalidades da endometriose concomitantemente, quadro considerado como um dos mais graves.

Nas tabelas 11 e 12, na qual é realizada a avaliação dos marcadores de acordo com as classificações histológicas para os grupos 2A e 2B (doença ovariana e intestinal independentes) pode ser observado que a expressão proteica da n-caderina na doença classificada como ‘estromal e bem diferenciada’ se mostrou maior quando comparada às outras classificações, tanto nas lesões de ovário como nas lesões de intestino, assim como houve uma diferença na expressão da beta-catenina na endometriose intestinal, que também se mostrou maior na classificação ‘estromal e bem diferenciada’. Estes resultados reforçam que a n-caderina parece ser uma molécula de grande relevância nas lesões de endometriose, podendo trazer informações adicionais com relação ao prognóstico da doença, influenciando a agressividade, o potencial de migração,

proliferação e invasibilidade que as células das lesões apresentam. (Abrao et al, 2003; Qi et al, 2005).

Moléculas de adesão e Receptores Hormonais

Contudo, uma análise de grande importância pode ser observada na tabela 13, na qual a expressão proteica das moléculas de adesão foi relacionada com a expressão dos receptores hormonais, estrogênio e progesterona. Sendo a endometriose uma doença dependente dos hormônios esteroides, a passagem pelo processo da TEM poderia ser estimulada pela ação destes hormônios, o que seria detectado neste estudo pela relação entre a expressão das moléculas de adesão e a expressão dos receptores hormonais. Deste modo, pode ser observado na tabela 13 que a expressão da n-caderina foi diretamente proporcional à expressão do receptor de estrogênio, o que pode significar que um aumento da ação deste hormônio esteja envolvido na mediação do aumento da expressão da n-caderina, o que atribuiria às células das lesões de endometriose uma maior capacidade migratória, maior capacidade de invasibilidade e a elevada resistência à apoptose, reforçando o fato de que este hormônio esteja envolvido na patogênese desta doença.

Com os rápidos avanços da ciência, trazendo milhares de novos conhecimentos a todo instante, espera-se que a compreensão dos mecanismos envolvidos na origem e desenvolvimento da endometriose ocorra em breve, fazendo com que surjam abordagens menos invasivas e mais eficientes de diagnóstico e tratamento desta doença. O presente trabalho buscou colaborar com o entendimento de um possível processo envolvido na patogênese da endometriose: a transição epitélio-mesênquima. Através da observação de pacientes com as três modalidades da endometriose concomitantemente, o que possibilitou a comparação da expressão dos marcadores propostos entre os locais de lesão, com principal destaque à alteração da molécula de adesão n-caderina, os resultados encontrados sugerem que a TEM possui um papel importante nos mecanismos de migração, proliferação e invasibilidade que as células desta afecção apresentam. Este estudo mostrou ainda, que a endometriose ovariana apresenta peculiaridades que a faz diferente patologicamente das doenças superficial e profunda. Contudo, são necessários estudos adicionais para entender o papel que as moléculas

relacionadas ao processo de transição epitélio-mesênquima desempenham nesta doença complexa e enigmática.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados e discutidos, conclui-se:

- ❖ A avaliação da expressão proteica dos marcadores relacionados à transição epitélio-mesênquima no grupo de pacientes acometidas por endometriose peritoneal, ovariana e intestinal concomitantemente, demonstraram que a n-caderina foi menos expressa no estroma das lesões de ovário quando comparada às lesões de peritônio e intestino, o que indica a peculiaridade desta manifestação da doença. A expressão da e-caderina e da beta-catenina não apresentaram alterações, sendo invariavelmente expressas no epitélio e não apresentando nenhuma expressão no estroma de todas as lesões. A expressão proteica dos receptores hormonais revelou que a endometriose ovariana apresenta uma menor expressão dos receptores de estrogênio e progesterona nas células epiteliais em comparação com doença peritoneal e intestinal.
- ❖ A avaliação da expressão proteica dos marcadores relacionados à transição epitélio-mesênquima no grupo de pacientes acometidas por endometriose ovariana e intestinal independentes demonstrou a expressão proteica das moléculas de adesão e-caderina e beta-catenina também não apresentou alterações, mas a n-caderina foi mais expressa no epitélio do ovário do que no epitélio do intestino. Com relação aos receptores hormonais, foi observado que o receptor de progesterona está diminuído das lesões ovarianas em comparação às intestinais, assim como no grupo com as três doenças concomitantes.
- ❖ As variações da expressão dos marcadores propostos entre o componente epitelial e estromal se comportaram de acordo com o esperado para o tecido endometrial típico, não acrescentando informações à etiopatogenia da endometriose.
- ❖ A expressão proteica dos marcadores propostos; e-caderina, n-caderina, beta-catenina, receptor de estrogênio e receptor de progesterona; não é influenciada pela fase do ciclo menstrual das pacientes.
- ❖ A classificação histológica da endometriose não possui relação com a expressão proteica dos marcadores e-caderina, receptor de estrogênio e receptor de progesterona, mas a maior expressão da n-caderina e da beta-catenina parece estar relacionada com a classificação 'estromal e bem diferenciada' o que pode estar

relacionado com o grau de agressividade e conseqüentemente com o prognóstico da doença.

- ❖ A correlação da expressão proteica das moléculas de adesão e dos receptores hormonais demonstrou uma relação direta da quantidade de n-caderina e do receptor de estrogênio, o que pode demonstrar a importância desta molécula de adesão na progressão da doença possivelmente estimulada pelo estrogênio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrao MS, Neme RM., Carvalho FM, Aldrighi JM, Pinotti JA. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. *Int J Gynaecol Obstet*, 2003, 82:31-40.

Abrao MS, Neme RM, Averbach M, Petta CA, Aldrighi JM. Rectal endoscopic ultrasound with a radial probe in the assessment of rectovaginal endometriosis. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*, 2004, 11:50–4.

Abrão MS, Podgaec S, Dias JA, Averbach M, Garry R, Ferraz Silva LF, et al. Deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum and lymph nodes. *Fertil Steril*, 2006; 86:5437.

Abrao MS, Dias JA Jr, Bellelis P, Podgaec S, Bautzer CR, Gromatsky C. Endometriosis of the ureter and bladder are not associated diseases. *Fertil Steril*. 2009, 91(5):1662-7.

Acloque, H.; Adams, M.S.; Fishwick, K.; Bronner-Fraser, M.; Nieto, M.A. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest*, 2009, 119(6):1438-1449.

Alves CP, Fonseca AS, Muys BR, de Barros E Lima Bueno R, Bürger MC, de Souza JE, Valente V, Zago MA, Silva WA Jr. The lincRNA Hotair is required for epithelial-to-mesenchymal transition and stemness maintenance of cancer cells lines. *Stem Cells*. 2013, 10.1002/stem.1547.

Arruda MS, Petta CA, Abrão MS, Benetti-Pinto CL. Time elapsed from onset of symptoms to diagnosis of endometriosis in a cohort study of Brazilian women. *Hum Reprod*. 2003, 18(4):756-9.

Attar E, Bulun SE. Aromatase inhibitors: the next generation of therapeutics for endometriosis? 2006, *Fertil Steril* 85:1307–1318

Bacac, M.; Stamenkovic, I. Metastatic cancer cell. *Annu. Rev. Pathol.*, 2008, 3, 221-247.

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..

Bolos, V.; Peinado, H.; Perez-Moreno, M.A.; Fraga, M.F.; Esteller, M.; Cano, A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 3): 499-511.

Bulun SE, Lin Z, Imir G, Amin S, Demura M, Yilmaz B, Martin R, Utsunomiya H, Thung S, Gurates B, TamuraM, Langoi D, Deb S. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. 2005, *Pharmacol Rev* 57:359–383

Bulun SE, Cheng YH, Yin P, Imir G, Utsunomiya H, Attar E, Innes J, Julie Kim J Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, 248:94–103

Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril*, 2012, 98(3):511-9.

Cambiaghi A. S. Guiaendometriose.com.br. Instituto Paulista de Ginecologia e Obstetrícia. Disponível em: <http://www.guiaendometriose.com.br/endometriose-superficialperito-neal.html>. Acesso em: 12/09/2013.

Carvalho FM, Abrao MS. Histopathology of endometriosis: the importance of gynecologist and pathologist interaction. In: Abrao MS, editor. *Endometriosis: a contemporaneous approach*. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. p. 35 –44.

Chen, Y., Li, H., Huang, C., Twu, N., Yen, M., Wang, P., Chou, T., Liu, Y., Chao, K., Yang, M. Oestrogen-induced epithelial-mesenchymal transition of endometrial epithelial cells contributes to the development of adenomyosis. *J Pathol*, 2010, 222:261-270.

Darai, E, Leblanc M, Walker-Combrouze F, Bringuier A-F, Madelenat P, Scoazec J-Y. Expression of cadherins and CD44 isoforms in ovarian endometrial cysts. *Hum Reprod* 1998; 13: 1346–52

D'Hooghe TM, Debrock S. Endometriosis, retrograde menstruation and peritoneal inflammation in women and in baboons. *Hum Reprod Update*, 2002, Jan-Feb;8(1):84-8.

Dias JA, Podgaec S, Abrão MS. Atlas de cirurgia ginecológica: 1 endometriose do trato urinário, 2006.

Donnez J, Van Langendonckt A. Typical and subtle atypical presentations of endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2004. 16(5):431-7.

Donnez J, Tatarchuk TF, Bouchard P, Puscasiu L, Zakharenko NF, Ivanova T, Ugocsai G, Mara M, Jilla MP, Bestel E, Terrill P, Osterloh I, Loumaye E. Ulipristal acetate versus placebo for fibroid treatment before surgery. 2012, *N Engl J Med* 366:409–420.

Eskenazi, B., M. Warner, et al. "Validation study of nonsurgical diagnosis of endometriosis." *Fertil Steril*, 2001. 76(5): 929-35.

Fujimoto J, Hirose R, Sakaguchi H, Tamaya T. Expression of oestrogen receptor-alpha and -beta in ovarian endometriomata. *Mol Hum Reprod*. 1999; 5:742–747.

Fujishita A., Nakane PK., Koji T., Masuzaki H., Chavez RO., Yamabe T., Ishimaru T.. Expression of estrogen and progesterone receptors in endometrium and peritoneal endometriosis: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Fertility and sterility*. 1997, 67,5: 856-864.

Geiger, T.R.; Peeper, D.S. Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796(2), 293-308.

Gellersen B, Fernandes MS, Brosens JJ. Non-genomic progesterone actions in female reproduction. *Hum Reprod Update* 2009, 15: 119–138.

Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet*. 2004, 364(9447):1789-99.

Goodwin M, Yap AS. Classical cadherin adhesion molecules: coordinating cell adhesion, signaling and the cytoskeleton. *J Mol Histol*, 2004; 35:839–844.

Gomes, L.R., Terra, F.T., Sogayar, M.C., Labriola, L. *Epithelial-Mesenchymal transition: Implications in Câncer Progression and Metastasis*, 2011.

Goulding H, Pinder S, Cannon P, Pearson D, Nicholson R, Snead D, et al. A new immunohistochemical antibody for the assessment of estrogen receptor status on routine formalin-fixed tissue samples. *Hum Pathol* 1995;26:291-4.

Han SJ, Hawkins SM, Begum K, Jung SY, Kovanci E, Qin J, Lydon JP, DeMayo FJ, O'Malley BW. A new isoform of steroid receptor coactivator-1 is crucial for pathogenic progression of endometriosis. *Nat Med*. 2012; 18(7):1102-11.

Hay, E.D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*. 1995; 154(1):8-20.

Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, et al. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 2000;148:779–790.

Heiss G, Wallace R, Anderson GL, Aragaki A, Beresford SA, Brzyski R, Chlebowski RT, Gass M, LaCroix A, Manson JE, Prentice RL, Rossouw J, StefanickML. Health risks and benefits 3 years after stopping randomized treatment with estrogen and progestin. 2008, *JAMA* 299:1036–1045

Ishikawa H, Ishi K, Serna VA, Kakazu R, Bulun SE, Kurita T. Progesterone is essential for maintenance and growth of uterine leiomyoma. 2010, *Endocrinology* 151:2433–2442.

Iwano, M.; Plieth, D.; Danoff, T.M.; Xue, C.; Okada, H.; Neilson, E.G. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest*, 2002, 110(3): 341-350.

Jeanes, A.; Gottardi, C.J.; Yap, A.S. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*, 2008, 27(55): 6920-6929.

Kalluri, R., Neilson, E.G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J.Clin.Invest*, 2003, 112:1776-1784.

Kalluri, R., Weinberg, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest*, 2009, 119:1420-1428.

Kamergorodsky, G. , Ribeiro, P., Galvão, M., Abrão, M., Donadio, D., Lemos, N., Aoki, T.. Histologic classification of specimens from women affected by superficial endometriosis, deeply infiltrating endometriosis, and ovarian endometriomas. *Fertility and Sterility*, 2009.

Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, Osteen K, Taylor RN, Lessey BA, GiudiceLC. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology*, 2002, 143:2119–2138.

Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 1990, 9:1603–1614.

Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A, Saridogan E. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod*. 2005 Oct;20(10):2698-704.

Kiemer, A.K.; Takeuchi, K.; Quinlan, M.P. Identification of genes involved in epithelial-mesenchymal transition and tumor progression. *Oncogene*, 2001, 20(46): 6679-6688.

Kim JJ, Kurita T, Bulun SE. Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocr Rev*. 2013 Feb;34(1):130-62. doi: 10.1210/er.2012-1043.

Kirkwood, B. R., Sterne, J. A. C. *Essential medical statistics*. 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts, 2006, USA. p.502.

Lee, J.M., Dedhar, S., Kalluri, R., and Thompson, E.W. The epithelial-mesenchymal transition new insights in signaling development, and disease. 2006. *J. Cell. Biol.* 172:973-981.

Lessey BA, Alexander PS, Horwitz KB. The subunit structure of human breast cancer progesterone receptors: characterization by chromatography and photoaffinity labeling. *Endocrinology* 1983, 112:1267–1274

Matsuzaki, S., Darcha C. Epithelial to mesenchymal transition like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis. *Human Reproduction*, Vol.0, No.0 pp. 1–10, 2012.

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

Missmer SA, Cramer DW. The epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2003, 30:1-19.

Moreno-Bueno, G.; Portillo, F.; Cano, A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene*, 2008, 27(55): 6958-6969.

Murphy AA, Castellano PZ. RU486: pharmacology and potential use in the treatment of endometriosis and leiomyomata uteri. 1994, *Curr Opin Obstet Gynecol* 6:269–278.

Neme, R. Endometriose, o que é a doença da mulher moderna. *Albert Einstein Hospital Israelita*. 2012. Disponível em: <http://www.einstein.br/einsteinsaude/endometriose/Paginas/o-que-e.aspx>. Acesso em: 28/08/2013.

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

Noble LS, Simpson ER, Johns A, Bulun SE. Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81:174–179. [PubMed: 8550748]

Noel, J.C., Chapron, C., Bucella, D., Buxant, F., Peny, M.O., Fayt, I., Borghese, B., Anaf, V. Estrogen and progesterone receptors in smooth muscle component of deep infiltrating endometriosis. *Fertility and Sterility*, 2010, 93(6):1774-1777.

Olive DL, Pritts EA. Treatment of endometriosis. *N Engl J Med*, 2001, 345(4):266-75.

Patten K. V, Parkash V, Jain D. Cadherin expression in gastrointestinal tract endometriosis: possible role in deep tissue invasion and development of malignancy. *Modern Pathology*, 2010; 23:38-44.

Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007;7:415–428.

Peralta-Soler PA, Knudsen KA, Tecson-Miguel A, McBrearty FX, Han AC, Salazar H. Expression of E-cadherin and N-cadherin in surface epithelial-stromal tumors of the ovary distinguishes mucinous from serous and endometrioid tumors. *Hum Pathol* 1997; 28: 734–9.

Podgaec S, Abrao MS, Dias JA, Rizzo LV, de Oliveira RM, Baracat EC. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum Reprod*, 2007, 22: 1373-79.

Podgaec S, Abrao MS, Dias JA Jr, Rizzo LV, de Oliveira RM, Baracat EC. Epigastric pain relating to menses can be a symptom of bowel endometriosis. *Hum Reprod*. 2007 May;22(5):1373-9.

Poncelet C, Leblanc M, Walker-Combrouze F, et al. Expression of cadherins and CD44 isoforms in human endometrium and peritoneal endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002;81:195–203.

Poole AJ, Li Y, Kim Y, Lin SC, Lee WH, Lee EY. Prevention of Brcal-mediated mammary tumorigenesis in mice by a progesterone antagonist. 2006, *Science* 314:1467–1470.

Pupo-Nogueira A, De Oliveira RM, Petta CA, Podgaec S, Dias Jr JA, Abrão MS. Vascular endothelial growth factor concentrations in the serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *International Journal of Obstetrics*, 2007, 99: 33-37.

Qi J, Wang J, Romanyuk O, Siu CH. Involvement of Src family kinases in N-cadherin phosphorylation and beta-catenin dissociation during transendothelial migration of melanoma cells. *Mol Biol Cell*. 2005, 1261-72.

Ramos HV, Simões Mde J, Pontes PA, Neves LR, Barbosa LH, De Biase NG, Oshima CT. Immunohistochemistry as a method to study elastic fibers of human vocal fold. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2005 Jul-Aug;71(4):486-91.

Ryan, I.P., Taylor, R.N., Endometriosis and infertility: new concepts. *Obstet. Gynecol. Surv*. 1997, 52, 365–371.

Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol*, 1927, 14:422-46.

Shaw JA, Udokang K, Mosquera J-M, Chauhan H, Jones JL, Walker RA. Oestrogen receptors alpha and beta differ in normal human breast and breast carcinomas. *J Pathol* 2002;198:450-7.

Simpson J.L., Elias S., Malinak L.R., Buttram V.C. Jr. Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies *Am J Obstet Gynecol*, 1980, 137: pp. 327–331

Siristatidis C, Nissotakis C, Chrelias C, Iacovidou H, Salamalekis E. Immunological factors and their role in the genesis and development of endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res*, 2006, 32:162-170.

Sobrado, V.R.; Moreno-Bueno, G.; Cubillo, E.; Holt, L.J.; Nieto, M.A.; Portillo, F.; Cano, A. The class I bHLH factors E2-2A and E2-2B regulate EMT. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 7): 1014-1024.

Sociedade Americana de medicina reprodutiva. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997;67:817–821.

Takeichi, M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Current Opinion in Cell Biology*. 1993, Pages 806–811.

Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006; 7:131–142.

Thiery, J.P.; Acloque, H.; Huang, R.Y.; Nieto, M.A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 2009, 139:871-890.

Thomas EJ, Campbell IG. Evidence that endometriosis behaves in a malignant manner *Gynecol Obstet Invest*, 2000a, 50 (Suppl 1):2–10.

Thomas EJ, Campbell IG. Molecular genetic defects in endometriosis. *Gynecol Obstet Invest*, 2000b, 59 (suppl. 1): 4450.

Thompson, E.W.; Newgreen, D.F.; Tarin, D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelialmesenchymal transition? *Cancer Res*, 2005, 65(14), 5991-5995; discussion 5995.

Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, et al. Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res* 2000;60:3650–3654.

Tsuchiya B, Sato Y, Kameya T, Okayasu I, Mukai K.. Differential expression of N-cadherin and E-cadherin in normal human tissues. *Arch Histol Cytol* 2006; 69:135–145.

Vercellini P, Cortesi I, Crosignani PG. Progestins for symptomatic endometriosis: a critical analysis of the evidence. *Fertil Steril*, 1997, 68:393–401

Vercellini P., Fedele L., Aimi G., Pietropaolo G., Consonni D., Crosignani P.G. Association between endometriosis stage, lesion type, patient characteristics and severity of pelvic pain symptoms: a multivariate analysis of over 1000 patients. *Hum Reprod.* 2007, 22(1):266-71.

Vercellini P, Crosignani P, Somigliana E, Viganò P, Frattaruolo MP, Fedele L ‘Waiting for Godot’: a commonsense approach to the medical treatment of endometriosis. *Hum Reprod*, 2011, 26:3–13.

Von Rokitansky C. Ueber Uterusdrusen-Neubildung in Uterus und Ovarial-Sarcomen. *Ztschr. KK Gesellsch. Aerzte Wien*, 1860, 37:577-581.

Xie M, Zhu X, Liu Z, Shrubsole M, Varma V, Mayer IA, Dai Q, Chen Q, You S. Membrane progesterone receptor alpha as a potential prognostic biomarker for breast cancer survival: a retrospective study. *PLoS One*. 2012;7(4):e35198.

Wang, X.; Zheng, M.; Liu, G.; Xia, W.; McKeown-Longo, P.J.; Hung, M.C.; Zhao, J. Kruppel-like factor 8 induces epithelial to mesenchymal transition and epithelial cell invasion. *Cancer Res*, 2007, 67(15): 7184-7193.

Wang W., Li Y., Maitituoheti M., Yang R., Wu Z., Wang T., Ma D., Wang S. Association of an oestrogen receptor gene polymorphism in Chinese Han women with endometriosis and endometriosis-related infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 2013, 26, 93– 98.

Weed JC, Arquembourg PC. Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? *Clin Obstet Gynecol*, 1980, 23:885-89.

Wu MH, Sun HS, Lin CC, Hsiao KY, Chuang PC, Pan HA, Tsai SJ. Distinct mechanisms regulate cyclooxygenase-1 and -2 in peritoneal macrophages of women with and without endometriosis. *Mol Hum Reprod*. 2002; 8(12):1103-10.

Yang, J.; Mani, S.A.; Donaher, J.L.; Ramaswamy, S.; Itzykson, R.A.; Come, C.; Savagner, P.; Gitelman, I.; Richardson, A.; Weinberg, R.A. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 2004, 117(7): 927-939.

Yang, J.; Weinberg, R.A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell*, 2008, 14(6), 818-829.

Yin P, Lin Z, Cheng YH, Marsh EE, Utsunomiya H, Ishikawa H, Xue Q, Reierstad S, Innes J, Thung S, Kim JJ, XuE, Bulun SE. Progesterone receptor regulates Bcl-2 gene expression through direct binding to its promoter region in uterine leiomyoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92:4459–4466

Yin X, Pavone ME, Lu Z, Wei J, Kim JJ. Increased activation of the PI3K/AKT pathway compromises decidualization of stromal cells from endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2012, 97:E35–E43

Yoshida K, Yoshihara K, Adachi S, Haino K, Nishino K, Yamaguchi M, Nishikawa N, Kashima K, Yahata T, Masuzaki H, Katabuchi H, Ikuma K, Suginami H, Tanaka K. Possible involvement of the E-cadherin gene in genetic susceptibility to endometriosis. *Hum Reprod.* 2012;27(6):1685-9.

Yoshihara K, Tajima A, Komata D, Yamamoto T, Kodama S, Fujiwara H, Suzuki M, Onishi Y, Hatae M, Sueyoshi K et al. Gene expression profiling of advanced-stage serous ovarian cancers distinguishes novel subclasses and implicates ZEB2 in tumor progression and prognosis. *Cancer Sci* 2009;100:1421–1428.

Zeisberg, M.; Neilson, E.G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*, 2009, 119:1429-1437.

Zeitvogel A., Baumann R., Starzinski-Powitz A.. Identification of an Invasive, N-Cadherin Expressing Epithelial Cell Type in Endometriosis Using a New Cell Culture Model. *American Journal of Pathology*, 2001, 159: 5: 1839-1852.

ANEXOS

Anexo A – Aprovação do Comitê de ética em pesquisa (HCFMUSP).



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0547/11

Título: A TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA NA ENDOMETRIOSE

Pesquisador Responsável: Mauricio Simões Abrão

Pesquisador Executante: Ana Carolina Machado Poppe

Co-autores: Annacarolina Silva, Leticia Labriola

Finalidade Acadêmica: Mestrado

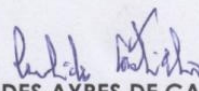
Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 17/08/2011 o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 18 de Agosto de 2011


PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo B – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO .M F

DATA NASCIMENTO: . / /.

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE:

.....
CEP: TELEFONE: DDD ()

2. RESPONSÁVEL LEGAL: .

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):.

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO M F

DATA NASCIMENTO: . / /

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE: .

CEP: TELEFONE: DDD ()

II - DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: A TRANSIÇÃO EPITÉLIO-

MESÊNQUIMA NA ENDOMETRIOSE.

PESQUISADOR: PROF. DR. MAURÍCIO SIMÕES ABRÃO

CARGO/FUNÇÃO: PROFESSOR DOUTOR INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL M
.CRM-SP: 52842

UNIDADE DO HCFMUSP: DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO X

RISCO MA R

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 02 ANOS

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – A endometriose é uma doença ginecológica que acontece quando o tecido da parte interna do útero (endométrio) se espalha em outros órgãos e regiões do abdômen, tais como: ovário, intestino, bexiga e peritônio. Esta doença pode causar dores intensas no abdomen, principalmente cólicas no período menstrual, comprometendo seriamente a qualidade de vida das mulheres portadoras de endometriose. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. O objetivo deste estudo é pesquisar um processo que ocorre nas células (conhecido como transição epitélio-mesênquima), que possivelmente esteja envolvido no aparecimento da endometriose.

2 – Neste estudo, não serão realizados procedimentos experimentais.

3 – A cirurgia de abdômen (laparoscopia) será realizada nas pacientes que necessitarem de confirmação de diagnóstico de endometriose ou para aquelas que já possuem diagnóstico confirmado e estão fazendo tratamento com medicamentos. Para essas pacientes, a laparoscopia será realizada com o objetivo de tratamento, quando a medicação utilizada não consegue diminuir ou eliminar os sintomas clínicos provocados pela doença.

Será realizado procedimento rotineiro de coleta de tecido (endométrio) no abdômen, durante a cirurgia, para análise do tipo de endometriose, fazendo parte do diagnóstico ou tratamento de sua doença. Neste mesmo material coletado aproveitaremos para pesquisar o processo citado acima. Os dados do seu prontuário médico, referentes a esta internação, também serão consultados.

4 – Os efeitos adversos da cirurgia serão aqueles relacionados ao procedimento de laparoscopia: como sonolência e náuseas causadas pela anestesia geral, leve desconforto abdominal e dor. Todos os efeitos adversos pós-cirúrgicos serão eliminados pela administração de medicamentos específicos (anti-inflamatórios, anti-eméticos, analgésicos, antibióticos) no período pós-cirúrgico.

5 – Não há benefício direto para o participante: Trata-se de estudo testando a hipótese de que poderemos identificar células que possivelmente estejam envolvidas no aparecimento

da endometriose. Somente no final do estudo poderemos concluir algum benefício para a paciente, ou seja, conhecer melhor a causa da endometriose e posteriormente contribuir para a escolha do melhor tratamento.

6 – Não há procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais a paciente possa optar.

7 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Maurício Simões Abrão, que pode ser encontrado no endereço (Hospital das Clínicas – Av. Dr. Eneas de Carvalho, 255 – Divisão de Clínica Ginecológica, 10º andar, sala 10.166 – São Paulo/SP, Tel.(11) 30.69.66.47). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar, tel: (11)30.69.64.42, ramais 16, 17, 18 ou 20. FAX: (11)30.69.64.42 – ramal 26. E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

9 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outras pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhuma paciente.

10 – A paciente tem o direito de se manter atualizada sobre todos os resultados parciais da pesquisa.

11 – Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

12 – Os dados obtidos e o material coletado serão utilizados somente para o estudo em questão.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "A TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MENSENQUIMA NA ENDOMETRIOSE".

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data: ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data: ____/____/____

_____ (para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

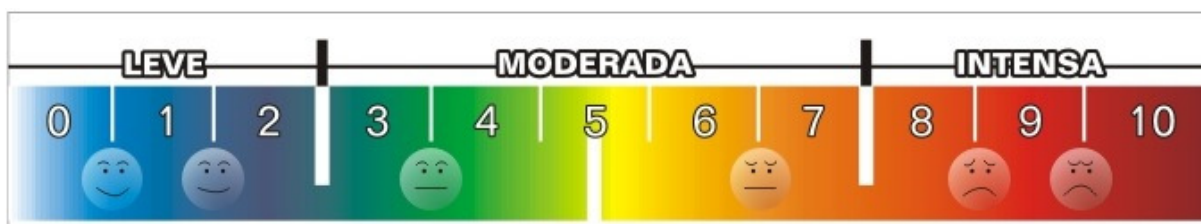
Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido desta paciente ou representante legal para a participação neste estudo

Assinatura do responsável pelo estudo

Data: ____/____/____

Dr. Prof. Dr. Maurício Simões Abrão

Anexo C – Escala visual analógica de dor (EAD).



A Escala visual analógica de dor (EAD) auxilia na aferição da intensidade da dor no paciente, é um instrumento importante para verificar a evolução do paciente durante o tratamento e mesmo a cada atendimento, de maneira mais fidedigna. Também é útil para analisar se o tratamento está sendo efetivo, qual procedimento tem surtido melhores resultados, assim como se há alguma deficiência no tratamento, de acordo com o grau de melhora ou piora da dor.

A EAD pode ser utilizada no início e no final de cada atendimento, registrando o resultado sempre na evolução. Para utilizar a EAD o profissional deve questionar o paciente quanto ao seu grau de dor, sendo que 0 significa ausência total de dor e 10 o nível de dor máximo suportado pelo paciente.

Anexo D - Dados demográficos e fase do ciclo menstrual (Grupo 1: N = 18).

Código de identificação (N=18)	Idade	Estatura (m)	Peso (Kg)	Índice de massa corpórea - IMC	FASE DO CICLO MENSTRUAL NA CIRURGIA
264	29	1,65	54	19,83	PROLIFERATIVA
370	35	1,64	57	21,19	PROLIFERATIVA
373	32	1,63	52,5	19,76	SECRETORA
398	30	1,59	70	27,69	NÃO REFERIDO*
417	31	1,67	52	18,65	SECRETORA
425	34	1,58	46,9	18,79	SECRETORA
434	40	1,72	63	21,30	MENSTRUAL
438	38	1,64	59	21,94	SECRETORA
468	35	1,70	70	24,22	NÃO REFERIDO*
469	32	1,69	68	23,81	MENSTRUAL
478	30	1,60	53	20,70	SECRETORA
480	37	1,54	48	20,24	SECRETORA
490	36	1,65	63	23,14	SECRETORA
516	21	1,58	58	23,23	NÃO REFERIDO (PAC VIRGEM)*
561	29	1,72	64	21,63	MENSTRUAL
574	33	1,58	57	22,83	NÃO REFERIDO*
590	31	1,60	63,5	24,80	MENSTRUAL
2035	32	1,58	48	19,23	PROLIFERATIVA

* Para as pacientes 398, 468, 516 e 574 não foi possível obter a informação do dia do ciclo menstrual. na cirurgia.

Anexo E - Tabulação dos dados clínicos das pacientes do grupo 1.

Código de identificação (N=18)	Paridade	Infertilidade	EAD Dismenorreia	EAD Dor pélvica acíclica	EAD Dispareunia de profundidade	EAD Alteração intestinal	EAD Alteração urinária
264	0	PRIMARIA	8	0	2	0	0
370	0	PRIMARIA	7	0	2	0	0
373	0	SEM TENTATIVA	10	7	0	10	0
398	0	SEM TENTATIVA	10	5	8	5	0
417	0	PRIMARIA	5	0	0	0	0
425	0	PRIMARIA	9	4	0	0	0
434	0	PRIMARIA	9	6	7	5	0
438	1	NÃO	9	0	5	0	0
468	2	NÃO	9	0	6	0	0
469	0	PRIMARIA	8	0	0	0	0
478	0	PRIMARIA	9	0	4	0	8
480	1	NÃO	9	6	10	9	0
490	0	SEM TENTATIVA	7	8	7	0	0
516	0	SEM TENTATIVA	10	0	0	0	0
561	0	SEM TENTATIVA	5	0	3	5	0
574	0	PRIMARIA	8	6	6	0	0
590	0	SEM TENTATIVA	5	0	7	0	0
2035	0	SEM TENTATIVA	3	1	6	0	0

EAD: escala analógica de dor (0 - 10).

Anexo F - Dados demográficos e fase do ciclo menstrual (grupo 2A: N = 44).

Código de identificação (N=44)	Idade	Estatura (m)	Peso (Kg)	Índice de massa corpórea - IMC	FASE DO CICLO MENSTRUAL NA CIRURGIA
153	32	1,70	66	22,84	MENSTRUAL
174	27	1,71	64	21,89	PROLIFERATIVA
221	25	1,63	75	28,23	SECRETORA
227	29	1,57	73	29,62	SECRETORA
241	30	1,65	59	21,67	SECRETORA
250	45	1,56	51	20,96	PROLIFERATIVA
253	35	1,72	70	23,66	SECRETORA
260	33	1,67	65	23,31	PROLIFERATIVA
265	38	1,78	64,7	20,42	NÃO REFERIDO*
270	43	1,60	55,2	21,56	PROLIFERATIVA
295	31	1,68	63,6	22,53	PROLIFERATIVA
307	34	1,59	80	31,64	SECRETORA
322	29	1,61	58	22,38	NÃO REFERIDO*
348	32	1,63	54	20,32	SECRETORA
366	37	1,74	58	19,16	PROLIFERATIVA
367	45	1,72	70	23,66	SECRETORA
382	35	1,63	54	20,32	PROLIFERATIVA
395	26	1,67	51	18,29	NÃO REFERIDO*
399	29	1,56	54	22,19	PROLIFERATIVA
407	21	1,60	43	16,80	SECRETORA
416	34	1,64	60	22,31	SECRETORA
426	35	1,80	71,1	21,94	SECRETORA
443	34	1,71	54	18,47	SECRETORA
463	32	1,56	49,5	20,34	SECRETORA
486	37	1,51	62	27,19	SECRETORA
491	29	1,69	63	22,06	SECRETORA
494	43	1,70	64	22,15	PROLIFERATIVA
507	30	1,61	62	23,92	SECRETORA
515	28	1,71	58	19,84	SECRETORA
522	39	1,70	84	29,07	SECRETORA
524	37	1,60	50	19,53	SECRETORA
530	45	1,70	56	19,38	PROLIFERATIVA
2018	30	1,58	52,6	21,07	PROLIFERATIVA
2031	31	1,63	56	21,08	PROLIFERATIVA
2033	29	1,65	56	20,57	SECRETORA
2034	34	1,68	60	21,26	SECRETORA
2047	36	1,56	62,1	25,52	NÃO REFERIDO*
2068	28	1,52	42	18,18	SECRETORA
2070	34	1,58	50	20,03	SECRETORA
2078	42	1,58	70	28,04	SECRETORA
2079	39	1,65	66	24,24	SECRETORA
2080	45	1,60	83	32,42	SECRETORA
2083	30	1,69	55	19,26	NÃO REFERIDO*
2095	39	1,56	86	35,34	SECRETORA

* Para as pacientes 265, 322, 395, 2047 e 2083 não foi possível obter a informação do dia do ciclo menstrual na cirurgia.

Anexo G - Tabulação dos dados clínicos das pacientes (grupo 2A: N = 44).

Código de identificação (N=44)	Paridade	Infertilidade	EAD Dismenorreia	EAD Dor pélvica acíclica	EAD Dispareunia de profundidade	EAD Alteração intestinal	EAD Alteração urinária
153	0	PRIMARIA	8	2	2	0	0
174	1	SEM TENTATIVA	7	0	0	7	0
221	0	SEM TENTATIVA	7	6	0	0	0
227	0	SEM TENTATIVA	7	4	7	10	0
241	0	PRIMARIA	0	0	6	0	0
250	2	NÃO	6	0	6	8	0
253	0	PRIMARIA	7	4	4	6	0
260	0	PRIMARIA	8	0	0	0	0
265	1	SECUNDARIA	0	0	0	0	0
270	0	SEM TENTATIVA	6	0	0	0	0
295	0	SEM TENTATIVA	8	0	7	10	0
307	0	SEM TENTATIVA	10	6	3	0	0
322	0	SEM TENTATIVA	5	0	0	0	0
348	0	PRIMARIA	3	0	0	0	0
366	0	SEM TENTATIVA	6	8	0	0	0
367	1	NÃO	2	0	0	0	0
382	0	NÃO	0	0	6	0	0
395	0	SEM TENTATIVA	9	0	0	0	0
399	0	PRIMARIA	7	0	0	0	0
407	0	SEM TENTATIVA	6	0	0	0	0
416	0	PRIMARIA	8	2	6	5	0
426	0	SEM TENTATIVA	5	0	0	0	0
443	0	SEM TENTATIVA	10	10	0	0	0
463	0	PRIMARIA	9	2	3	0	0
486	0	PRIMARIA	0	0	0	0	0
491	0	PRIMARIA	7	0	5	0	0
494	0	PRIMARIA	10	10	10	0	8
507	0	SEM TENTATIVA	10	7	0	6	5
515	0	PRIMARIA	8	5	7	0	0
522	2	NÃO	6	6	7	0	0
524	0	SEM TENTATIVA	0	0	6	0	0
530	1	NÃO	1	0	0	0	0
2018	0	SEM TENTATIVA	0	6	0	0	0
2031	0	PRIMARIA	5	0	0	0	0
2033	0	PRIMARIA	6	0	0	0	0
2034	0	SEM TENTATIVA	10	0	4	0	0
2047	0	PRIMARIA	9	0	5	0	0
2068	0	SEM TENTATIVA	4	2	0	0	0
2070	0	SEM TENTATIVA	9	0	7	0	0
2078	2	NÃO	8	0	5	0	0
2079	0	PRIMARIA	8	0	0	6	0
2080	0	SEM TENTATIVA	5	0	0	0	0
2083	1	NÃO	8	2	0	0	0
2095	0	PRIMARIA	0	7	0	0	0

EAD: escala analógica de dor (0 - 10).

Anexo H - Dados demográficos e fase do ciclo menstrual (grupo 2B: N = 41).

Código de identificação (N=41)	Idade	Estatura (m)	Peso (Kg)	Índice de massa corpórea - IMC	FASE DO CICLO MENSTRUAL NA CIRURGIA
102	37	1,54	57,8	24,37	MENSTRUAL
104	39	1,53	66,4	28,37	SECRETORA
106	24	1,72	55,7	18,83	SECRETORA
118	31	1,58	48	19,23	SECRETORA
122	35	1,57	58,3	23,65	SECRETORA
151	28	1,65	65	23,88	SECRETORA
177	30	1,61	53	20,45	SECRETORA
195	45	1,54	68	28,67	NÃO REFERIDO*
199	28	1,67	48	17,21	SECRETORA
229	33	1,75	72	23,51	SECRETORA
242	35	1,62	63	24,01	SECRETORA
255	34	1,60	51,2	20,00	SECRETORA
259	32	1,69	85	29,76	SECRETORA
272	35	1,70	0	0,00	PROLIFERATIVA
308	43	1,75	64,8	21,16	PROLIFERATIVA
342	45	1,57	81	32,86	SECRETORA
343	38	1,65	94	34,53	SECRETORA
347	40	1,70	59	20,42	PROLIFERATIVA
352	28	1,57	44,6	18,09	PROLIFERATIVA
372	31	1,60	47	18,36	MENSTRUAL
381	34	1,59	64	25,32	SECRETORA
389	32	1,60	49	19,14	PROLIFERATIVA
404	31	1,63	56	21,08	PROLIFERATIVA
421	26	1,55	59	24,56	SECRETORA
451	35	1,65	56	20,57	SECRETORA
486	37	1,51	62	27,19	SECRETORA
495	45	1,64	0	0,00	SECRETORA
499	27	1,60	58	22,66	SECRETORA
528	33	1,70	67	23,18	SECRETORA
534	29	1,63	53	19,95	SECRETORA
536	36	1,57	52	21,10	SECRETORA
577	42	1,58	73	29,24	SECRETORA
582	32	1,64	54,9	20,41	SECRETORA
585	32	1,52	54	23,37	MENSTRUAL
588	37	1,63	51	19,20	SECRETORA
589	38	1,60	56	21,88	SECRETORA
2048	41	1,62	63,9	24,35	SECRETORA
2049	39	1,57	56,1	22,76	SECRETORA
2074	36	1,60	64,5	25,20	PROLIFERATIVA
2081	33	1,66	58	21,05	PROLIFERATIVA
2070	34	1,58	50	20,03	SECRETORA
2082	45	1,67	70	25,10	PROLIFERATIVA

* Para a paciente 195 não foi possível obter a informação do dia do ciclo menstrual na cirurgia.

Anexo I - Tabulação dos dados clínicos das pacientes (grupo 2B: N = 41).

Código de identificação (N=44)	Paridade	Infertilidade	EAD Dismenorreia	EAD Dor pélvica acíclica	EAD Dispareunia de profundidade	EAD Alteração intestinal	EAD Alteração urinária
153	0	PRIMARIA	8	2	2	0	0
174	1	SEM TENTATIVA	7	0	0	7	0
221	0	SEM TENTATIVA	7	6	0	0	0
227	0	SEM TENTATIVA	7	4	7	10	0
241	0	PRIMARIA	0	0	6	0	0
250	2	NÃO	6	0	6	8	0
253	0	PRIMARIA	7	4	4	6	0
260	0	PRIMARIA	8	0	0	0	0
265	1	SECUNDARIA	0	0	0	0	0
270	0	SEM TENTATIVA	6	0	0	0	0
295	0	SEM TENTATIVA	8	0	7	10	0
307	0	SEM TENTATIVA	10	6	3	0	0
322	0	SEM TENTATIVA	5	0	0	0	0
348	0	PRIMARIA	3	0	0	0	0
366	0	SEM TENTATIVA	6	8	0	0	0
367	1	NÃO	2	0	0	0	0
382	0	NÃO	0	0	6	0	0
395	0	SEM TENTATIVA	9	0	0	0	0
399	0	PRIMARIA	7	0	0	0	0
407	0	SEM TENTATIVA	6	0	0	0	0
416	0	PRIMARIA	8	2	6	5	0
426	0	SEM TENTATIVA	5	0	0	0	0
443	0	SEM TENTATIVA	10	10	0	0	0
463	0	PRIMARIA	9	2	3	0	0
486	0	PRIMARIA	0	0	0	0	0
491	0	PRIMARIA	7	0	5	0	0
494	0	PRIMARIA	10	10	10	0	8
507	0	SEM TENTATIVA	10	7	0	6	5
515	0	PRIMARIA	8	5	7	0	0
522	2	NÃO	6	6	7	0	0
524	0	SEM TENTATIVA	0	0	6	0	0
530	1	NÃO	1	0	0	0	0
2018	0	SEM TENTATIVA	0	6	0	0	0
2031	0	PRIMARIA	5	0	0	0	0
2033	0	PRIMARIA	6	0	0	0	0
2034	0	SEM TENTATIVA	10	0	4	0	0
2047	0	PRIMARIA	9	0	5	0	0
2068	0	SEM TENTATIVA	4	2	0	0	0
2070	0	SEM TENTATIVA	9	0	7	0	0
2078	2	NÃO	8	0	5	0	0
2079	0	PRIMARIA	8	0	0	6	0
2080	0	SEM TENTATIVA	5	0	0	0	0
2083	1	NÃO	8	2	0	0	0
2095	0	PRIMARIA	0	7	0	0	0

EAD: escala analógica de dor (0 - 10).

Anexo J - Descrição dos marcadores segundo EDT de bexiga nas pacientes dos grupos 1, 2A e 2B, respectivamente.

Grupo 1 (peritônio, ovário e intestino)	EDT - Bexiga						p
	Não			Sim			
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	
Marcador							
Peritônio Epitélio N-Caderina	10	0	100	0	0	50	0,448
Peritônio Estroma N-Caderina	10	0	50	0	0	10	0,255
Peritônio Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Peritônio Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Peritônio Estroma Beta-catenina	0	0	0	0	0	0	>0,999
Peritônio Epitélio Receptor de Progesterona	100	40	100	100	100	100	0,367
Peritônio Estroma Receptor de Progesterona	100	40	100	100	70	100	0,664
Peritônio Epitélio Receptor de Estrogeno	100	0	100	90	0	100	0,368
Peritônio Estroma Receptor de Estrogeno	50	0	90	60	0	90	0,683
Ovário Epitélio N-Caderina	100	0	100	25	0	100	0,567
Ovário Estroma N-Caderina	0	0	100	0	0	0	0,579
Ovário Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Estroma Beta-catenina	0	0	0	0	0	0	>0,999
Ovário Epitélio Receptor de Progesterona	40	0	100	25	5	80	0,432
Ovário Estroma Receptor de Progesterona	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Epitélio Receptor de Estrogeno	80	0	100	80	70	100	0,852
Ovário Estroma Receptor de Estrogeno	70	10	80	50	0	70	0,093
Intestino Epitélio N-Caderina	0	0	100	0	0	100	0,342
Intestino Estroma N-Caderina	0	0	100	0	0	20	0,315
Intestino Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Estroma Beta-catenina	0	0	0	0	0	0	>0,999
Intestino Epitélio Receptor de Progesterona	100	30	100	100	100	100	0,519
Intestino Estroma Receptor de Progesterona	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Epitélio Receptor de Estrogeno	90	80	100	100	100	100	0,058
Intestino Estroma Receptor de Estrogeno	70	40	100	90	50	100	0,109

Grupo 2A (ovário)	EDT - Bexiga						p
	Não			Sim			
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	
Marcador							
Ovário Epitélio N-Caderina	60	0	100	0	0	100	0,240
Ovário Estroma N-Caderina	0	0	100	0	0	0	0,291
Ovário Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Estroma Beta-catenina	0	0	0	0	0	0	>0,999
Ovário Epitélio Receptor de Progesterona	45	0	100	87,5	0	100	0,251
Ovário Estroma Receptor de Progesterona	100	0	100	100	100	100	0,261
Ovário Epitélio Receptor de Estrogeno	90	0	100	90	0	100	0,742
Ovário Estroma Receptor de Estrogeno	60	0	90	70	0	90	0,952

Grupo 2B (intestino)	EDT - Bexiga						p
	Não			Sim			
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	
Marcador							
Intestino Epitélio N-Caderina	0	0	100	0	0	100	0,576
Intestino Estroma N-Caderina	0	0	60	0	0	100	0,436
Intestino Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Estroma Beta-catenina	0	0	100	0	0	0	0,577
Intestino Epitélio Receptor de Progesterona	100	20	100	100	100	100	0,557
Intestino Estroma Receptor de Progesterona	100	60	100	100	100	100	0,158
Intestino Epitélio Receptor de Estrogeno	100	0	100	100	70	100	>0,999
Intestino Estroma Receptor de Estrogeno	70	0	100	64,5	30	90	0,923

Anexo K - Descrição dos marcadores segundo EDT de ureter nas pacientes dos grupos 1, 2A e 2B, respectivamente.

Grupo 1 (peritônio, ovário e intestino)	EDT - Ureter						p
	Não			Sim			
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	
Marcador							
Peritônio Epitélio N-Caderina	0	0	100	0	0	0	0,418
Peritônio Estroma N-Caderina	0	0	50	0	0	0	0,418
Peritônio Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Peritônio Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Peritônio Estroma Beta-catenina	0	0	0	0	0	0	>0,999
Peritônio Epitélio Receptor de Progesterona	100	40	100	100	100	100	0,607
Peritônio Estroma Receptor de Progesterona	97,5	40	100	100	100	100	0,215
Peritônio Epitélio Receptor de Estrogeno	100	0	100	50	0	100	0,471
Peritônio Estroma Receptor de Estrogeno	55	0	90	25	0	50	0,141
Ovário Epitélio N-Caderina	75	0	100	0	0	0	0,303
Ovário Estroma N-Caderina	0	0	100	0	0	0	0,803
Ovário Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Estroma Beta-catenina	0	0	0	0	0	0	>0,999
Ovário Epitélio Receptor de Progesterona	30	0	100	20	20	20	0,531
Ovário Estroma Receptor de Progesterona	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Epitélio Receptor de Estrogeno	80	0	100	100	100	100	0,119
Ovário Estroma Receptor de Estrogeno	70	0	80	40	30	50	0,144
Intestino Epitélio N-Caderina	0	0	100	0	0	0	0,439
Intestino Estroma N-Caderina	0	0	100	0	0	0	0,312
Intestino Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Estroma Beta-catenina	0	0	0	0	0	0	>0,999
Intestino Epitélio Receptor de Progesterona	100	30	100	100	100	100	0,803
Intestino Estroma Receptor de Progesterona	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Epitélio Receptor de Estrogeno	100	80	100	100	100	100	0,397
Intestino Estroma Receptor de Estrogeno	70	40	100	90	90	90	0,271

Grupo 2A (ovário)	EDT - Ureter						p
	Não			Sim			
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	
Marcador							
Ovário Epitélio N-Caderina	30	0	100	50	0	100	0,906
Ovário Estroma N-Caderina	0	0	100	0	0	0	0,425
Ovário Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Estroma Beta-catenina	0	0	0	0	0	0	>0,999
Ovário Epitélio Receptor de Progesterona	50	0	100	60	5	100	0,794
Ovário Estroma Receptor de Progesterona	100	0	100	100	100	100	0,411
Ovário Epitélio Receptor de Estrogeno	90	0	100	90	0	100	0,831
Ovário Estroma Receptor de Estrogeno	60	0	90	50	0	80	0,864

Grupo 2B (intestino)	EDT - Ureter						p
	Não			Sim			
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	
Marcador							
Intestino Epitélio N-Caderina	0	0	100	0	0	100	0,744
Intestino Estroma N-Caderina	0	0	100	0	0	100	0,539
Intestino Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Estroma Beta-catenina	0	0	100	0	0	0	0,697
Intestino Epitélio Receptor de Progesterona	100	20	100	100	100	100	0,701
Intestino Estroma Receptor de Progesterona	100	60	100	100	100	100	0,358
Intestino Epitélio Receptor de Estrogeno	100	0	100	100	70	100	0,789
Intestino Estroma Receptor de Estrogeno	70	0	100	40	20	80	0,299

Anexo L - Descrição dos marcadores segundo EDT retrocervical nas pacientes dos grupos 1, 2A e 2B, respectivamente.

Grupo 1 (peritônio, ovário e intestino)	EDT - Retrocervical						p
	Não			Sim			
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	
Marcador							
Peritônio Epitélio N-Caderina	60	20	100	0	0	100	0,119
Peritônio Estroma N-Caderina	10	0	20	0	0	50	0,904
Peritônio Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Peritônio Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Peritônio Estroma Beta-catenina	0	0	0	0	0	0	>0,999
Peritônio Epitélio Receptor de Progesterona	100	100	100	100	40	100	0,607
Peritônio Estroma Receptor de Progesterona	100	100	100	97,5	40	100	0,215
Peritônio Epitélio Receptor de Estrogênio	100	100	100	100	0	100	0,262
Peritônio Estroma Receptor de Estrogênio	85	80	90	50	0	90	0,050
Ovário Epitélio N-Caderina	50	0	100	50	0	100	>0,999
Ovário Estroma N-Caderina	0	0	0	0	0	100	0,715
Ovário Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Estroma Beta-catenina	0	0	0	0	0	0	>0,999
Ovário Epitélio Receptor de Progesterona	100	100	100	30	0	100	0,168
Ovário Estroma Receptor de Progesterona	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Epitélio Receptor de Estrogênio	80	60	100	80	0	100	0,935
Ovário Estroma Receptor de Estrogênio	65	60	70	65	0	80	0,871
Intestino Epitélio N-Caderina	0	0	0	0	0	100	0,439
Intestino Estroma N-Caderina	75	50	100	0	0	100	0,053
Intestino Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Estroma Beta-catenina	0	0	0	0	0	0	>0,999
Intestino Epitélio Receptor de Progesterona	100	100	100	100	30	100	0,715
Intestino Estroma Receptor de Progesterona	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Epitélio Receptor de Estrogênio	90	80	100	100	80	100	0,595
Intestino Estroma Receptor de Estrogênio	85	70	100	70	40	100	0,294

Grupo 2A (ovário)	EDT - Retrocervical						p
	Não			Sim			
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	
Marcador							
Ovário Epitélio N-Caderina	100	0	100	25	0	100	0,242
Ovário Estroma N-Caderina	0	0	0	0	0	100	0,482
Ovário Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Estroma Beta-catenina	0	0	0	0	0	0	>0,999
Ovário Epitélio Receptor de Progesterona	20	10	100	50	0	100	0,882
Ovário Estroma Receptor de Progesterona	100	100	100	100	0	100	0,513
Ovário Epitélio Receptor de Estrogênio	70	50	90	90	0	100	0,574
Ovário Estroma Receptor de Estrogênio	70	50	80	55	0	90	0,334

Grupo 2B (intestino)	EDT - Retrocervical						p
	Não			Sim			
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	
Marcador							
Intestino Epitélio N-Caderina	35	0	70	0	0	100	0,621
Intestino Estroma N-Caderina	0	0	0	0	0	100	0,584
Intestino Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Estroma Beta-catenina	0	0	0	0	0	100	0,814
Intestino Epitélio Receptor de Progesterona	100	100	100	100	20	100	0,816
Intestino Estroma Receptor de Progesterona	100	100	100	100	60	100	0,578
Intestino Epitélio Receptor de Estrogênio	100	100	100	100	0	100	0,332
Intestino Estroma Receptor de Estrogênio	85	80	90	70	0	100	0,153

Anexo M - Descrição dos marcadores segundo EDT retrocervical nas pacientes dos grupos 1, 2A e 2B, respectivamente.

Grupo 1 (peritônio, ovário e intestino)	EDT - Vagina						p
	Não			Sim			
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	
Marcador							
Peritônio Epitélio N-Caderina	0	0	50	20	0	100	0,371
Peritônio Estroma N-Caderina	0	0	50	15	0	30	0,210
Peritônio Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Peritônio Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Peritônio Estroma Beta-catenina	0	0	0	0	0	0	>0,999
Peritônio Epitélio Receptor de Progesterona	100	100	100	100	40	100	0,146
Peritônio Estroma Receptor de Progesterona	95	40	100	100	70	100	0,465
Peritônio Epitélio Receptor de Estrogênio	100	0	100	90	0	100	0,190
Peritônio Estroma Receptor de Estrogênio	50	0	80	50	0	90	0,414
Ovário Epitélio N-Caderina	25	0	100	100	0	100	0,627
Ovário Estroma N-Caderina	0	0	0	0	0	100	0,346
Ovário Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Estroma Beta-catenina	0	0	0	0	0	0	>0,999
Ovário Epitélio Receptor de Progesterona	30	0	95	80	5	100	0,273
Ovário Estroma Receptor de Progesterona	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Epitélio Receptor de Estrogênio	90	60	100	80	0	100	0,215
Ovário Estroma Receptor de Estrogênio	70	50	80	50	0	80	0,133
Intestino Epitélio N-Caderina	0	0	100	0	0	100	0,903
Intestino Estroma N-Caderina	0	0	100	0	0	100	0,458
Intestino Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Estroma Beta-catenina	0	0	0	0	0	0	>0,999
Intestino Epitélio Receptor de Progesterona	100	30	100	100	100	100	0,346
Intestino Estroma Receptor de Progesterona	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Epitélio Receptor de Estrogênio	90	80	100	100	80	100	0,348
Intestino Estroma Receptor de Estrogênio	60	40	100	80	50	100	0,241

Grupo 2A (ovário)	EDT - Vagina						p
	Não			Sim			
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	
Marcador							
Ovário Epitélio N-Caderina	0	0	100	70	0	100	0,303
Ovário Estroma N-Caderina	0	0	100	0	0	10	0,781
Ovário Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Ovário Estroma Beta-catenina	0	0	0	0	0	0	>0,999
Ovário Epitélio Receptor de Progesterona	60	0	100	40	0	100	0,313
Ovário Estroma Receptor de Progesterona	100	0	100	100	100	100	0,329
Ovário Epitélio Receptor de Estrogênio	90	0	100	90	30	100	0,496
Ovário Estroma Receptor de Estrogênio	50	0	90	70	0	80	0,809

Grupo 2B (intestino)	EDT - Vagina						p
	Não			Sim			
	Mediana	Mínimo	Máximo	Mediana	Mínimo	Máximo	
Marcador							
Intestino Epitélio N-Caderina	0	0	100	0	0	100	0,379
Intestino Estroma N-Caderina	0	0	100	0	0	100	0,921
Intestino Epitélio E-Caderina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Epitélio Beta-catenina	100	100	100	100	100	100	>0,999
Intestino Estroma Beta-catenina	0	0	100	0	0	0	0,419
Intestino Epitélio Receptor de Progesterona	100	100	100	100	20	100	0,206
Intestino Estroma Receptor de Progesterona	100	60	100	100	85	100	0,938
Intestino Epitélio Receptor de Estrogênio	100	0	100	100	60	100	0,498
Intestino Estroma Receptor de Estrogênio	70	0	90	70	0	100	0,934