

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

**EXPRESSÃO DA CLAUDINA 3 E DA CLAUDINA 4 NA
ENDOMETRIOSE PÉLVICA PROFUNDA**

IVETE DE ÁVILA

Belo Horizonte

2019

IVETE DE ÁVILA

**EXPRESSÃO DA CLAUDINA 3 E DA CLAUDINA 4 NA
ENDOMETRIOSE PÉLVICA PROFUNDA**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher da Faculdade de Medicina da UFMG como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Saúde da Mulher.

Área de concentração: Ginecologia.

Orientadora: Dr^a. Márcia Mendonça Carneiro.

Belo Horizonte

FM-UFMG

2019

Ávila, Ivete de.
A958e Expressão da Claudina 3 e da Claudina 4 na Endometriose
Pélvica Profunda [manuscrito]. / Ivete de Ávila. - - Belo Horizonte:
2020.
69f.: il.
Orientador (a): Márcia Mendonça Carneiro.
Área de concentração: Saúde da Mulher.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina.

1. Endometriose. 2. Claudina-3. 3. Claudina-4. 4. Proteínas. 5.
Células Epiteliais. 6. Dissertação Acadêmica. I. Carneiro, Márcia
Mendonça. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de
Medicina. III. Título.

NLM: WP 390



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA MULHER

UFMG

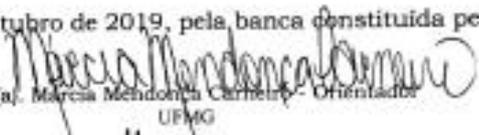
FOLHA DE APROVAÇÃO

EXPRESSÃO DA CLAUDINA 3 E DA CLAUDINA 4 NA ENDOMETRIOSE PÉLVICA PROFUNDA

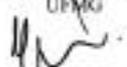
IVETE DE AVILA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SAÚDE DA MULHER, como requisito para obtenção do grau de Doutor em SAÚDE DA MULHER, área de concentração PATOLOGIA GINECOLÓGICA E REPRODUÇÃO.

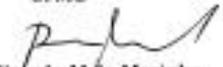
Aprovada em 04 de outubro de 2019, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Marcia Mendonça Carneiro - Orientador

UFMG


Prof(a). Agnaldo Lopes da Silva Filho

UFMG


Prof(a). Ricardo Melo Marinho

FCMMG


Prof(a). Rodrigo Gomes da Silva

UFMG


Prof(a). Alexandre de Almeida Barra

UFOP

Belo Horizonte, 4 de outubro de 2019.

À Dr^a. Ivone Dirk de Sousa Filogonio,
In memoriam.

AGRADECIMENTOS

A todos que colaboraram na realização deste trabalho:

Dr^a. Márcia de Mendonça Carneiro, orientadora desta tese, pela disponibilidade sem limites, pela generosidade de ensinar com palavras e atitudes de surpreendente sabedoria.

Prof^a. Paula Teixeira Vidigal, do Laboratório de Biologia Molecular do Setor de Anatomia Patológica de Medicina Legal da Faculdade de Medicina (FM) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela realização da pesquisa laboratorial e pela cooperação com solicitude e conhecimento sem os quais não poderíamos realizar este trabalho.

A Fernanda César e Silva Borges, técnicas do Laboratório de Biologia Molecular do Setor de Anatomia Patológica de Medicina Legal da FM da UFMG, pela execução da prática laboratorial com perícia e competência imprescindíveis à realização desta pesquisa.

Dr^a. Patrícia Salomé Gouvêa Braga e funcionários do Serviço de Anatomia Patológica do Biocor Instituto, pela contribuição material e benevolência essenciais ao desenvolvimento deste estudo.

Aos alunos do programa de iniciação científica Carla Camara Moreira, Thais Moreira e Victor Wilson Soares Campos pelo trabalho e dedicação que tornaram possível a efetivação desta pesquisa.

Aos colegas de equipe de Cirurgia Multidisciplinar de Endometriose, pela parceria e convivência prestimosa.

Aos meus familiares e amigos, pela tolerância, incentivo e amor nesta jornada.

RESUMO

INTRODUÇÃO: a endometriose profunda (EP) é uma forma invasiva da endometriose. As claudinas são as principais proteínas das junções entre células epiteliais cuja alteração pode estar relacionada à invasão tissular. As claudinas 3 (CLND-3) e 4 (CLDN-4) foram estudadas na hiperplasia e câncer endometrial com evidências interessantes para serem pesquisadas também na endometriose.

OBJETIVO: avaliar a imunexpressão das CLND-3 e CLDN-4 na EP e correlacionar com dados clínicos, bioquímicos e cirúrgicos. **MÉTODO:** pesquisa observacional no Laboratório de Biologia Molecular do Setor de Anatomia Patológica e Medicina Legal da FM da UFMG. Foi realizado exame imuno-histoquímica (IHQ) em 48 amostras obtidas em videolaparoscopias de 36 pacientes em tratamento de endometriose no Biocor Instituto, sendo 35 (73%) amostras de EP. A expressão na IHQ foi considerada presente (+) ou ausente (-) e a intensidade foi classificada em três categorias: fraca (+), moderada (++) e forte (+++ e ++++). O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (CAAE 41327014.5.0000.5149). Os dados foram submetidos à análise estatística, foram usados o teste Z de proporção e o qui-quadrado de Pearson exato, sendo considerado significativo o $p \leq 0,05$. **RESULTADOS:** verificou-se positividade de expressão da CLDN-3 em 60% das amostras de EP e da CLDN-4 em 80% delas. A expressão foi maior no sítio intestinal (CLDN-3: $p = 0,016$; CLDN-4: $p = 0,000$). Na maioria dos sítios predominou uma expressão de intensidade fraca, tanto da CLDN-3 (75,4%) quanto da CLDN-4 (73,8%). As expressões de CLDN-3 e CLDN-4 não se associaram ao uso de hormônio no pré-operatório, índice de massa corporal (IMC), vitamina D e antígeno de câncer 125 (CA125) séricos. A CLDN-3 mostrou mais positividade no estágio mais avançado da endometriose (grave).

CONCLUSÃO: foi evidenciado que as CLDN-3 e CLDN-4 estavam presentes na endometriose profunda. A expressão foi fraca, não foi influenciada por fatores clínicos ou laboratoriais, mas foi relacionada à extensão da doença. Provavelmente as claudinas estão relacionadas a potencial de invasão e crescimento da endometriose pélvica.

Palavras-chave: Endometriose. Endometriose profunda. Claudina 3. Claudina 4.

ABSTRACT

INTRODUCTION: deep endometriosis (DE) is an invasive form of endometriosis. Claudins are the main junction proteins between epithelial cells whose alteration may be related to tissue invasion. Claudins 3 (CLND-3) and 4 (CLDN-4) have been studied in hyperplasia and endometrial cancer with interesting evidence which prompted studies assess their possible role in endometriosis. **OBJECTIVE:** to evaluate the immunoeexpression of CLND-3 and CLDN-4 in DIE and correlate with clinical, biochemical and surgical data. **METHOD:** observational study at the Laboratório de Biologia Molecular do Setor de Anatomia Patológica e Medicina Legal da FM da UFMG. Immunohistochemical examination (IHC) was performed on 48 samples obtained by videolaparoscopy from 36 patients undergoing endometriosis treatment at Biocor Instituto, the majority 35 (73%) were DE samples. IHC expression was considered present (+) or absent (-) and intensity was classified into three categories: weak (+), moderate (++) and strong (+++ and ++++). The study protocol was approved by the Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (CAAE 41327014.5.0000.5149). The data were subjected to statistical analysis, the Z test for proportions and the Pearson exact chi-square test were used, and $p < 0.05$ was considered significant. **RESULTS:** CLDN-3 expression was positive in 60% of DE and 80% of CLDN-4 samples. Expression was higher in the intestines (CLDN-3: $p 0.016$; CLDN-4: $p 0.000$). In most sites, a weak intensity expression predominated, both from CLDN-3 (75.4%) and CLDN-4 (73.8%). Expressions of CLDN-3 and CLDN-4 were not associated with preoperative hormone use, body mass index (BMI), vitamin D, and serum 125 (CA125) antigen. CLDN-3 showed more positivity in the more advanced stage of endometriosis (severe). **CONCLUSION:** both CLDN-3 and CLDN-4 were expressed in deep endometriosis. Expression was weak, was not influenced by clinical or laboratory factors, but was related to the extent of the disease. Claudins may play a role in the potential for invasion and growth of pelvic endometriosis.

Keywords: Endometriosis. Deep endometriosis. Claudin 3. Claudin 4.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático de junções entre células endometriais.....	16
Figura 2 - Desenho esquemático da claudina.....	18
Figura 3 - Fluxograma das amostras.....	27
Figura 4 - Distribuição anatômica das 48 amostras.....	28
Figura 5 - Fotografia da lâmina de imuno-histoquímica.....	33
Figura 6 - Fotografias das lâminas de imuno-histoquímica com as classificações da intensidade de expressão das claudinas.....	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características das claudinas.....	18
Quadro 2 - Resumo das pesquisas sobre claudinas na endometriose.....	23
Quadro 3 - Variáveis analisadas.....	30
Quadro 4 - Anticorpos primários, secundários e metodologia usada no estudo imuno-histoquímico.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Casos de doença multifocal.....	34
Tabela 2 - Variáveis clínicas, bioquímicas e cirúrgicas das 36 pacientes.....	37
Tabela 3 - Expressão de CLDN-3 e CLDN-4 em 48 amostras de endometriose e endométrio uterino conforme sítios anatômicos.....	38
Tabela 4 - Expressão da CLDN-3 e da CLDN-4 em 35 amostras de endometriose profunda.....	39
Tabela 5 - Intensidade da expressão da CLDN-3 nos diferentes sítios anatômicos.....	40
Tabela 6 - Intensidade da expressão da CLDN-4 nos diferentes sítios anatômicos.....	40
Tabela 7 - Variáveis clínicas, bioquímicas e cirúrgicas relacionados às expressões da CLDN-3 e da CLDN-4 nas 48 amostras de endometriose e endométrio de 36 pacientes operadas no Biocor Instituto.....	42
Tabela 8 - Expressão da CLDN-3 e da CLDN-4 nas amostras de endometriose e endométrio em relação ao estágio da endometriose.....	42
Tabela 9 - Análise dos padrões de expressão combinada de CLDN-3 e CLDN-4 em sítios diferentes conforme pacientes.....	43

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 - Expressão de CLDN-3 e CLDN-4 em 48 amostras de endometriose e endométrio uterino conforme sítios anatômicos.....	38
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACO	Anticoncepcional oral
ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
CA125	Antígeno de câncer 125
CaO	Câncer de ovário
CaOE	Câncer de ovário associado à endometriose
CLND	Claudina
DPC	Dor pélvica crônica
EP	Endometriose profunda
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FM	Faculdade de Medicina
HE	Hematoxilina-eosina
IHQ	Imuno-histoquímica
IMC	Índice de massa corporal
ME	Microscopia eletrônica
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PubMed	Publicações Médicas
RNA	Ácido ribonucleico mensageiro
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TMA	<i>Tissue microarray</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WB	<i>Western blot</i>

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Endometriose profunda: conceito e importância.....	14
1.2 Claudinas.....	15
1.3 Qual o interesse em estudar claudinas na endometriose?.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
4 MÉTODOS.....	26
4.1 Delineamento.....	26
4.2 Amostra.....	26
4.3 Pacientes e dados analisados.....	28
4.4 Dados cirúrgicos analisados.....	29
4.5 Critérios de inclusão.....	31
4.6 Critérios de exclusão.....	31
4.7 Imuno-histoquímica.....	31
4.8 Padrões de expressão das claudinas na doença multifocal.....	33
4.9 Análise estatística.....	34
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Características clínicas, bioquímicas e cirúrgicas das pacientes.....	36
5.2 Expressão das claudinas em todas as amostras.....	37
5.3 Expressão das claudinas na endometriose profunda.....	39
5.4 Intensidade de expressão de CLDN-3 e CLDN-4.....	39

1 Este trabalho foi revisado com base nas novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724 de 17.04.2017.

5.5 Fatores clínicos, bioquímicos e cirúrgicos <i>versus</i> a expressão das claudinas.....	41
5.6 Expressão das claudinas em pacientes com doença multifocal.....	42
6 DISCUSSÃO.....	45
7 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXOS E APÊNDICES.....	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 Endometriose profunda: conceito e importância

A endometriose é uma doença crônica, inflamatória, estrogênio-dependente, com prevalência mundial de 10-30% das mulheres em idade reprodutiva e caracterizada pelo crescimento anômalo de tecido semelhante ao endométrio em sítios anatômicos fora do útero, principalmente na pelve. Ela é responsável pelos sintomas de dor pélvica e infertilidade com comprometimento significativo da qualidade de vida dessas mulheres (METTLER, 2017).

A endometriose profunda (EP) é uma forma de endometriose que penetra 5 mm ou mais abaixo da superfície peritoneal, com localização nos tecidos fibromusculares (CORNILLIE *et al.*, 1990). Na prática clínica, o conceito de endometriose profunda evoluiu para incluir aquela doença que infiltra órgãos e estruturas vitais, tais como intestinos (reto, sigmoide, ceco, apêndice vermiforme, íleo), vias urinárias (bexiga, ureteres), diafragma, fâscias e ligamentos uterinos (uterossacos, redondos), septo retovaginal e vagina (SCIOSCIA *et al.*, 2011; VERCELLINI *et al.*, 2004).

Nisolle e Donnez (1997) propuseram classificar a endometriose em três tipos, conforme sua localização anatômica, em: doença peritoneal (superficial), endometrioma ovariano (cística) e endometriose profunda infiltrativa (retroperitoneal). Essa divisão objetiva a melhor compreensão da etiopatogenia, da fisiopatologia e das manifestações clínicas desses três fenótipos: superficial, cístico e profundo.

Além de acometer sítios anatômicos diferentes da endometriose peritoneal e ovariana, a EP difere também dessas outras formas nos aspectos histopatológicos e clínico, visto ser mais invasiva e ter mostrado mais correlação com dor pélvica (KONINCKX *et al.*, 1994; NISOLLE; DONNEZ, 1997). Além disso, há proposições de que a patogênese da EP tenha particularidades distintas da doença ovariana e peritoneal (GORDTS; KONINCKX; BROSENS, 2017). Portanto, estudos com o propósito de averiguar aspectos moleculares dessa forma mais invasiva de

endometriose podem contribuir para elucidar as diferenças ou semelhanças entre as formas da endometriose, especialmente quanto à invasão celular nos diferentes sítios.

1.2. Claudinas

As claudinas (CLNDs) são as principais proteínas transmembrana que compõem as junções estreitas (JE)² das células epiteliais (LAG-NAG; MORIN, 2009). As JEs estão localizadas no ponto mais alto da parede lateral das membranas celulares (FIG. 1), com as funções de: a) manter as células epiteliais organizadas e polarizadas, determinando um compartimento apical e outro basocelular (função de barreira³); b) estabelecer controle seletivo do transporte paracelular de solutos entre as células adjacentes (função de portão⁴), regulando e restringindo a passagem de íons, ânions e cátions (GRUND; GRUMMER, 2018).

O nome claudina vem da palavra latina “*claudere*” (fechar), devido ao papel de barreira exercido por essas proteínas. As primeiras claudinas, CLDN-1 e CLDN-2, foram identificadas em 1998 (FURUSE *et al.*, 1998). Atualmente, elas constituem uma família de 27 membros, sendo que uma delas, a CLDN-13, está ausente em humanos. Elas têm padrões de expressão diferentes em tecidos diversos. São consideradas proteínas pequenas (20-34 kDa⁵), formadas por quatro hélices transmembrana, quatro sítios ou domínios de membrana, duas alças extracelulares e dois terminais intracelulares, sendo um amino (NH₂) e outro carboxi (COOH) (FIG. 2; QUADRO 1). O terminal carboxi faz ligação com proteínas intracelulares ZO através do domínio PDZ. As claudinas têm função conhecida de regular seletivamente o transporte paracelular de íons, provavelmente modulado pela sua primeira alça extracelular. Assim, como principais componentes das JEs, têm papel de controle no fluxo iônico paracelular e manutenção da polaridade celular. As

² A expressão junções estreitas foi usada no texto de doutorado de Tonon (2013), Botucatu, conhecida em inglês como *Tight Junctions* (TJ). Aparece também em alguns textos como junções firmes.

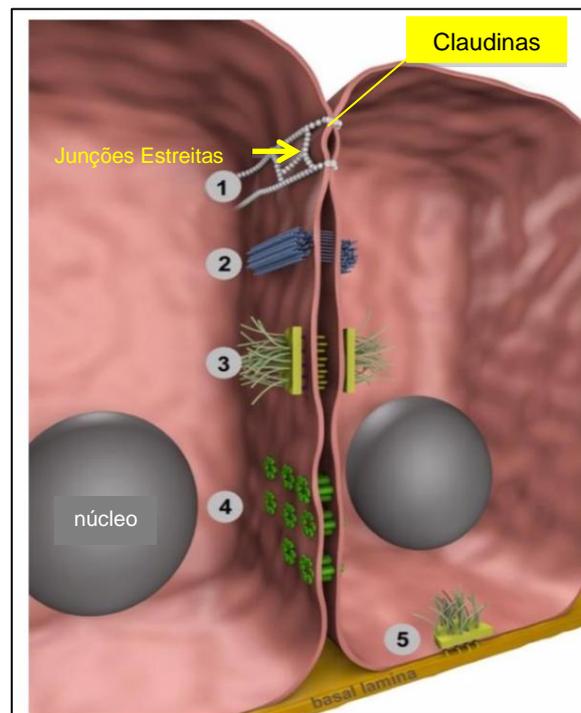
³ *Fence function* em inglês.

⁴ *Gate function* em inglês.

⁵ kDa= kilodaltons. O Dalton é a unidade de massa atômica, sendo que 1 Da peso equivale a 1 próton de Carbono.

CLDNs são classificadas em clássicas e não clássicas. As clássicas exibem uma sequência homóloga mais forte e incluem as CLDNs 1 a 10, 14, 15, 17 e 19. As não clássicas abrangem as claudinas 11 a 13, 16, 18 e 20 a 24. Não há, até o momento, conhecimento de diversidade funcional entre tais grupos (HASHIMOTO; YAGI; KONDOH, 2016; SINGH; DHAWAN, 2015).

Figura 1 - Desenho esquemático de junções entre células endometriais



(1) Junções estreitas; (2) Junções aderentes; (3) Desmossomos; (4) Junções gap; (5) Hemidesmossomos.

Fonte: adaptado de Grund e Grummer (2018), com permissão dos autores (ANEXO A).

1.3 Qual o interesse em estudar claudinas na endometriose?

A integridade do tecido epitelial é estabelecida pelo contato direto de célula a célula. Essas conexões entre células têm influência na fisiologia, homeostasia e remodelação dos tecidos, pois, além de manter as células epiteliais estáveis e polarizadas, elas têm importante ação mediadora seletiva no transporte de moléculas inter e paracelular. Uma vez que alterações das claudinas podem traduzir ruptura das junções celulares e, conseqüentemente, invasão tissular, fato inerente ao câncer, tornou-se interessante investigar esse comportamento também na endometriose (GRUND; GRUMMER, 2018), doença benigna que apresenta alguns

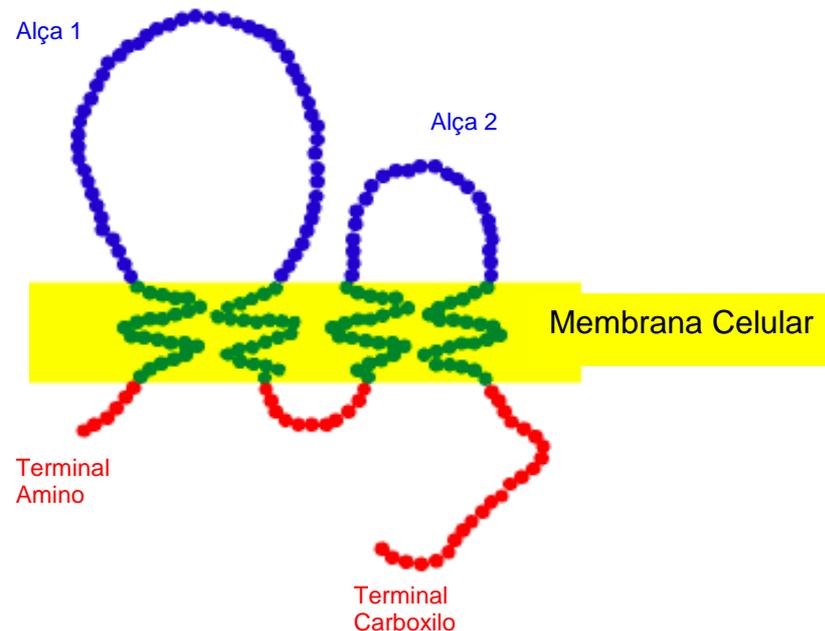
comportamentos semelhantes às neoplasias, como invasão, angiogênese e implantação (KOBAYASHI, 2000).

O interesse pelo estudo das claudinas na endometriose surgiu após a observação da alteração da expressão dessas proteínas na hiperplasia endometrial e no câncer endometrial. Pan *et al.* (2007) estudaram a expressão da claudina 3 (CLDN-3) e da claudina 4 (CLDN-4) no endométrio normal, na hiperplasia e no câncer endometrial. Acharam expressão significativamente alta dessas claudinas no adenocarcinoma endometrial e na hiperplasia endometrial com atipias e o contrário no endométrio da hiperplasia sem atipias, o qual mostrou expressão fraca. Além disso, o aumento da CLDN-4 esteve associado à invasão miometrial desse câncer. Estudaram também as junções estreitas pela microscopia eletrônica e constataram que o aumento das claudinas precedia a ruptura dessas conexões celulares, ou seja, essa elevação estava presente na hiperplasia antes de evoluir para o câncer. Assim, sugeriram que essas claudinas teriam potencial para serem utilizadas como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico do câncer endometrial.

Vários outros estudos têm sido conduzidos avaliando as relações entre claudinas e diversos cânceres. Foi observado aumento das CLDN-1 no câncer de cólon *in vitro* e *in vivo*, aumento da CLDN-2 em metástase de câncer de mama no fígado, aumento da CLDN-4 no câncer de ovário e baixa de CLDN-7 no câncer de mama (SINGH; DHAWAN, 2015). Nenhum deles, porém, investigou relações com a endometriose profunda, forma dessa doença que tem comportamento invasivo que assemelha ao câncer.

Este estudo propõe demonstrar a presença das CLDN-3 e CLDN-4 na endometriose profunda, até então reconhecidas apenas nas endometrioses peritoneal e ovariana, conferindo os sítios anatômicos e a intensidade dessa expressão. Além disso, buscaram-se evidências da associação da expressão dessas proteínas a fatores clínicos e bioquímicos. A expectativa é encontrar essas proteínas expressadas na endometriose profunda conforme já foi descrito nas outras formas de endometriose.

Figura 2 - Desenho esquemático da claudina



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Claudina> (adaptado)

Quadro 1 - Características das claudinas

Característica	Detalhes
Tipo de proteína	<i>Tetraspan</i> transmembrana
Família (n)	27 membros (26 em humanos) (CLDN-13 em camundongos)
Tamanho	20-34 kDa (considerada uma proteína pequena) variam em torno de 209 a 230 aminoácidos
Estrutura Molecular	4 sítios transmembrana
	4 hélices transmembrana
	2 alças ou domínios extracelulares que regulam a seletividade paracelular para ânions e cátions
	2 terminais intracelulares: Amino (NH ₂) Carboxilo (COOH):
	<ul style="list-style-type: none"> Comprimento variável entre as diferentes claudinas, Domínio PDZ permite interagir diretamente com as proteínas celulares ZO
Classificação	Clássicas: 1-10, 14, 15, 17 e 19. Não Clássicas: 11-13, 16, 18, e 20 -24.
Função	Regular transporte paracelular de íons (alça 1) Estabilizar as junções estreitas e a polaridade celular

Fonte: da autora.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Pesquisa no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), Publicações Médicas (PubMed), em 08/06/2018 sobre “*claudin and endometriosis*” nos últimos 10 anos apurou quatro citações. Repetindo a mesma pesquisa em 05/03/2019, foram achados poucos artigos a mais, todos eles discutidos a seguir e resumidos no QUADRO 2.

Pan, Weng e Wang (2008), pela primeira vez, investigaram a expressão da CLDN-4 no endométrio eutópico e ectópico em 35 mulheres com endometriose (endometriomas ovarianos) e em 35 mulheres sem endometriose (grupo-controle), utilizando imuno-histoquímica (IHQ), *Western blot* e *real time polymerase chain* (reação em cadeia da polimerase - PCR). Encontraram as JEs intactas pela microscopia eletrônica (ME) no endométrio eutópico, mas interrompidas na endometriose ovariana; a CLDN-4 corada fracamente na endometriose ovariana; e a expressão da CLDN-4 significativamente menor no endométrio ectópico comparado ao tópico. As expressões dessa proteína foram iguais no endométrio tópico das pacientes com endometriose e nos controles. Concluíram, dessa forma, que a baixa expressão da CLDN-4 pode ter papel na patogênese da endometriose.

Gaetje *et al.* (2008) analisaram a expressão de genes e de proteínas de várias claudinas (1, 3, 4, 5 e 7) em três sítios: no endométrio uterino, no peritônio normal e na endometriose peritoneal. Utilizaram análise por *microarray*, PCR e IHQ. Encontraram expressão fraca dos genes de CLDN-3, CLDN-4 e CLDN-7 na endometriose peritoneal pela análise de *microarray*. Na PCR a expressão foi igualmente baixa, mas sem atingir significância estatística, provavelmente devido ao reduzido número de amostras analisadas. Na endometriose peritoneal, as expressões das CLDN-3, CLDN-4 e CLDN-7 marcaram nas células glandulares enquanto a CLDN-5 marcou forte no endotélio vascular e a CLDN-1 nas células mesoteliais. As claudinas acusadas pela IHQ não mostraram dependência com as fases do ciclo menstrual nem com o uso de hormônios. Em conclusão, este estudo evidenciou expressão de claudinas na endometriose peritoneal, porém fraca em comparação ao endométrio uterino.

Partindo do princípio de que as CLDN-3 e CLDN-4 estavam envolvidas na transformação maligna do endométrio conforme publicação anterior (PAN *et al.*, 2007), Pan *et al.* (2009) buscaram associá-las à patogênese da endometriose. Eles investigaram a expressão dessas claudinas na endometriose de cisto ovariano (n=35), em endométrio de mulheres com endometriose ovariana (n=27) e em endométrio de mulheres sem endometriose (grupo-controle, n=35), distinguindo as diferentes fases do ciclo endometrial, proliferativa e secretora. Utilizaram a microscopia eletrônica (ME) para estudar as junções estreitas (JE), a imunohistoquímica (IHQ) para avaliar a expressão das claudinas e *Western blot* (WB) e PCR para averiguar a expressão dos genes.

Esses autores não encontraram JEs e constataram completa disjunção das células da endometriose ovariana com acúmulo de colágeno entre elas. As JEs estavam intactas nos endométrios uterinos, tanto de mulheres com endometriose quanto naquelas controles, independentemente de a fase ser proliferativa ou secretora. Registraram expressão fraca das CLDN-3 e CLDN-4 na endometriose ovariana e reduzida quando comparada ao endométrio uterino. A expressão dessas claudinas foi semelhante nos endométrios tanto de mulheres com endometriose quanto naquelas controles e, não variou conforme sua fase proliferativa ou secretora. Esses achados, expressão fraca de CLDN-3 e CLDN-4 no endometrioma ovariano, podem correlacionar com a formação da endometriose. Essa expressão de CLDN-3 e CLDN-4 menor na endometriose ovariana do que no endométrio eutópico sugere que uma alteração da propriedade da JE seja importante para a invasão endometrial.

Embora a endometriose cresça sob influência de estrogênio, a expressão endometrial das CLDN-3 e CLDN-4 não variou, dependendo da fase hormonal do ciclo, indicando diminuído papel do estrogênio e progesterona na expressão das claudinas e, conseqüentemente, na regulação das JEs (Pan *et al.*, 2009). Concluem que a baixa expressão dessas claudinas observada no endométrio ectópico pode ter importância para o potencial invasivo e crescimento do tecido endometrial fora do útero.

Com o objetivo de identificar marcador genético de risco de câncer de ovário em mulheres com endometriose, Banz *et al.* (2010) avaliaram a expressão de vários genes na endometriose ovariana (n=14), no câncer endometriode de ovário associado à endometriose (CaOE) (n=8), no câncer de ovário (CaO) (n=16) e em tecido ovariano normal benigno (n=9), sendo que todas amostras foram extraídas de peças cirúrgicas de ooforectomias. A expressão dos genes de CLDN-7 foi analisada utilizando-se PCR e *microarray* e estava aumentada no CaOE e no CaO, ausente na endometriose e no ovário normal. Consideram que os genes da CLDN-7, junto com outros, poderiam ser potenciais marcadores de malignidade para câncer de ovário.

Mikolajczyk, Wirstlein e Skrzypczak (2013) não avaliaram claudinas na endometriose mas sim a expressão do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) de CLDN-4 no endométrio uterino de mulheres com endometriose mínima e infertilidade. Compararam a expressão desse RNAm em tempo real (PCR) no endométrio de mulheres com infertilidade idiopática (n=36); naquelas com endometriose mínima (n=26); e naquelas sem infertilidade (grupo-controle, n=26). Acharam que a expressão de RNAm foi significativamente mais baixa nas paciente do grupo-controle quando comparada com as pacientes inférteis. Não houve, entretanto, diferença entre os grupos inférteis, com ou sem endometriose. Concluíram que níveis altos de CLDN-4 no endométrio podem contribuir para a infertilidade nos dois subgrupos estudados, com endometriose mínima e na infertilidade idiopática.

Em pesquisa que buscava genes marcadores de endometriose usando IHQ e *microarray*, Sohler *et al.* (2013) identificaram: elevada expressão de claudinas 1, 5 e 11; baixa expressão das claudinas 3, 4 e 7 em lesões de endometriose peritoneal (n=14) comparadas ao endométrio eutópico (n=17). Salientaram também que as lesões de endometriose peritoneal não estavam sincronizadas com as fases do endométrio uterino.

Horné *et al.* (2018) analisaram a expressão das CLDN-7 e CLDN-11 em amostras de endométrio (n=49), de endometriose ovariana (n=20), de endometriose peritoneal (n=17) e profunda infiltrativa (n=25). Analisaram pela IHQ cultura de tecido, *Western-*

Blot e PCR. Demonstraram essas duas claudinas tanto no endométrio quanto na endometriose. A CLDN-7 expressou-se igualmente no endométrio de mulheres com ou sem endometriose. Sua expressão foi moderada na endometriose, pouco mais na endometriose profunda e peritoneal, porém sem significância estatística. Achado diferente foi demonstrar que a CLDN-11 tinha localização mais basolateral na endometriose, podendo ter relação com a atividade da transição epitélio-mesenquimal e, possivelmente, contribuir para a patogênese da endometriose.

Concluindo, as pesquisas tenderam a mostrar baixa expressão das claudinas na endometriose e, geralmente, acharam essa expressão menor no endométrio ectópico (endometriose) do que aquela expressada no endométrio tópico (uterino) (QUADRO 2).

Quadro 2 - Resumo das pesquisas sobre claudinas na endometriose

Fonte	Tipo de endometriose (N)	Controle (N)	Claudinas	Metodologia	Resultados	Conclusão
Pan, Weng e Wang,, 2008	Ovariana (35)	Endométrio uterino(35)	CLDN-4	IHQ, <i>Western-Blot</i> , PCR, ME.	Expressão fraca de CLDN-4 no endometrioma, menor do que no endométrio. JE interrompidas (ME) no endometrioma e intacta no endométrio.	Expressão fraca de CLDN-4 pode ter papel na patogênese da endometriose.
Gaetje <i>et al.</i> , 2008	Peritoneal (22)	Endométrio uterino(22) Peritônio normal(3)	CLDN-1, 3,4,5 e 7	<i>Microarray</i> , PCR e IHQ.	Expressão fraca das CLDN-3, 4 e 7 na endometriose (genes e proteína), CLDN-5 forte no endotélio vascular e, CLDN-1 no mesotélio.	As CLDNs tiveram expressão na endometriose peritoneal fraca comparado ao endométrio tóxico.
Pan <i>et al.</i> , , 2009	Ovariana (35)	Endométrio uterino com(27) e sem(35) endometriose	CLDN-3 e CLDN-4	IHQ, <i>Western Blot</i> , PCR, ME.	JE (ME): intacta nos endométrios com ou sem endometriose, mas rompidas no endometrioma. Expressão CLDNs 3 e 4: fraca na endometriose; menor na endometriose do que no endométrio; não variou no endométrio com ou sem endometriose; não variou no endométrio conforme fase do ciclo.	A expressão baixa das CLDN-3 e CLDN-4 na endometriose pode ter importância para o potencial invasivo e crescimento do tecido endometrial fora do útero.
Banz <i>et al.</i> , 2010	Ovariana (14)	CaOE(8) CaO(16) Ovário normal(9)	CLDN-7 (genes)	<i>Microarray</i> , PCR.	Expressão CLDN-7 aumentada no câncer de ovário (CaOE, CaO) e, ausente na endometriose e no ovário normal.	Os genes da CLDN-7 têm potencial para serem marcadores de malignidade para câncer de ovário.
Mikolajczyk, Wirstlein e Skrzypczak, 2013	Nenhum	Endométrio uterino de mulheres inférteis com endometriose (26), com infertilidade idiopática (36) e férteis(26).	CLDN-4 (genes)	PCR.	Expressão mais baixa nas férteis do que nas inférteis. Inférteis com ou sem endometriose tiveram mesma expressão.	Altos níveis de CLDN-4 no endométrio podem ter papel na infertilidade com endometriose mínima ou idiopática.
Sohler <i>et al.</i> , 2013	Peritoneal (17)	Endométrio uterino(17)	CLDNs 1,5, 11, 3,4 e 7	<i>Microarray</i> , PCR.	Expressão dos genes: Alta: CLDNs-1,5,11 Baixa: CLDNs-2,4, 7	As lesões de endometriose peritoneal não estão sincronizadas com as fases do endométrio uterino.

Continua

Quadro 2 - Resumo das pesquisas sobre claudinas na endometriose - concluí

Fonte	Tipo de endometriose (N)	Controle (N)	Claudinas	Metodologia	Resultados	Conclusão
Horné <i>et al.</i> , 2018	Peritoneal (17) Ovariana (20) Profunda (25)	Endométrio uterino(49)	CLDN-7 CLDN-11	<i>Western-blot</i> , PCR, IHQ.	Presentes no endométrio uterino e na endometriose.	Expressão semelhante em todos os sítios de endometriose.

CLDN: claudina; PCR: Reação de cadeia de polimerase em tempo real; ME: microscopia eletrônica; JE: junção estreita; RNAm: RNA mensageiro; CaOE: câncer endometriode de ovário associado à endometriose; CA: câncer de ovário.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar e quantificar a expressão das claudinas 3 e 4 (CLDN-3 e CLDN-4) por meio da imuno-histoquímica nos sítios de endometriose pélvica.

3.2 Objetivos específicos

- a) Identificar a expressão das CLDN-3 e CLDN-4 nos sítios anatômicos da endometriose pélvica profunda.
- b) Correlacionar a expressão das CLDN-3 e CLDN-4 com dados clínicos, bioquímicos e cirúrgicos.

4 MÉTODOS

4.1 Delineamento

Trata-se de estudo observacional transversal, com abordagem qualitativa e quantitativa dos dados coletados.

O material foi obtido de mulheres com diagnóstico histológico de endometriose submetidas ao tratamento cirúrgico pela equipe multidisciplinar de endometriose do Biocor Instituto. Todos os casos foram operados pelo mesmo profissional (autora).

O trabalho seguiu a ordem:

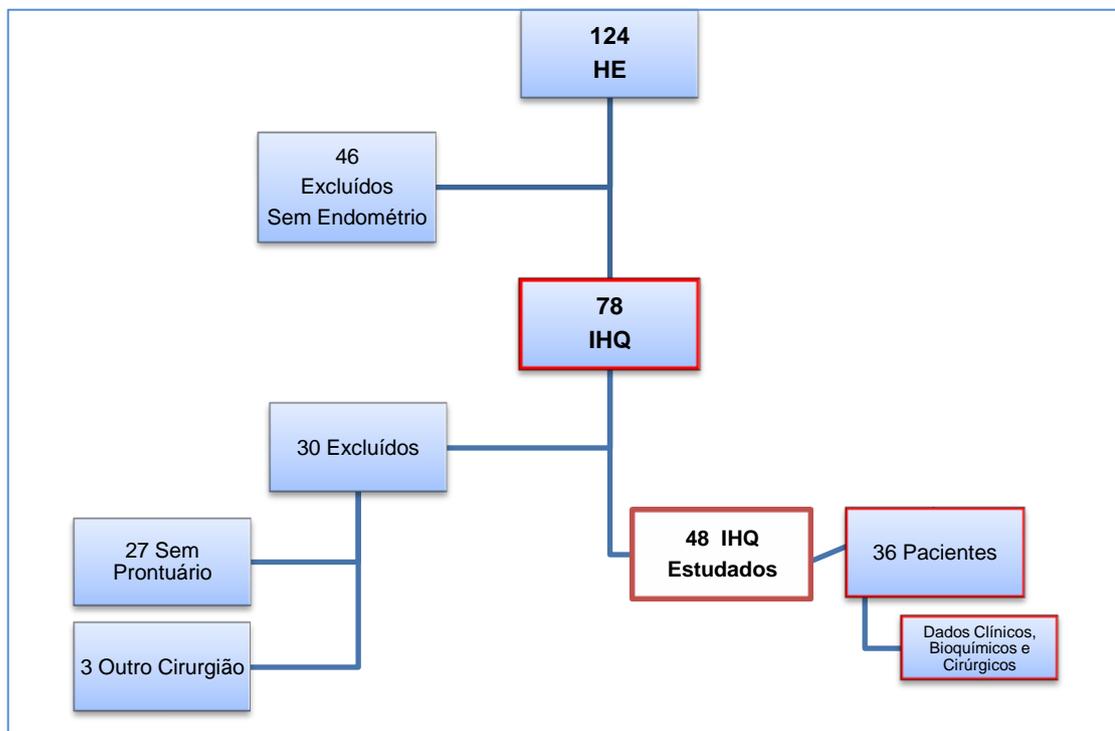
- a) Identificação das pacientes operadas e assinatura nos termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE);
- b) seleção de blocos de parafina do arquivo do Setor de Anatomia Patológica do Biocor Instituto proveniente do banco de dados de pacientes operadas por videolaparoscopia para tratamento de endometriose nessa instituição;
- c) identificação da origem anatômica das amostras (sítio anatômico);
- d) produção de lâminas de hematoxilina-eosina (HE) no Laboratório de Biologia Molecular do Setor de Anatomia Patológica e Medicina Legal da FM-UFMG;
- e) a seguir, no mesmo laboratório, foi realizada a imuno-histoquímica (IHQ) naquelas lâminas com endométrio para identificação das claudinas (CLDN-3 e CLDN-4);
- f) seleção dos prontuários para coleta de dados clínicos e cirúrgicos;
- g) análise estatística dos dados coletados.

4.2 Amostra

No Laboratório de Biologia Molecular do Setor de Anatomia Patológica e Medicina Legal da FM-UFMG foram produzidas 124 lâminas em hematoxilina-eosina (HE) a partir de blocos de parafina obtidos do Setor de Anatomia Patológica do Biocor

Instituto como amostras de conveniência⁶ de casos arquivados com diagnóstico histológico de endometriose. Dessas 124 lâminas, foram excluídas 46 porque não apresentaram endométrio nas lâminas de HE; 27 porque não foi encontrado o prontuário clínico ou cirúrgico; e três porque os prontuários estavam em nome de outro cirurgião. Das 78 lâminas submetidas à imuno-histoquímica restaram 48, que foram objeto do estudo e foram cruzadas com dados clínicos, bioquímicos e cirúrgicos identificados nos prontuários de 36 pacientes (FIG. 3; APÊNDICE A).

Figura 3 - Fluxograma das amostras

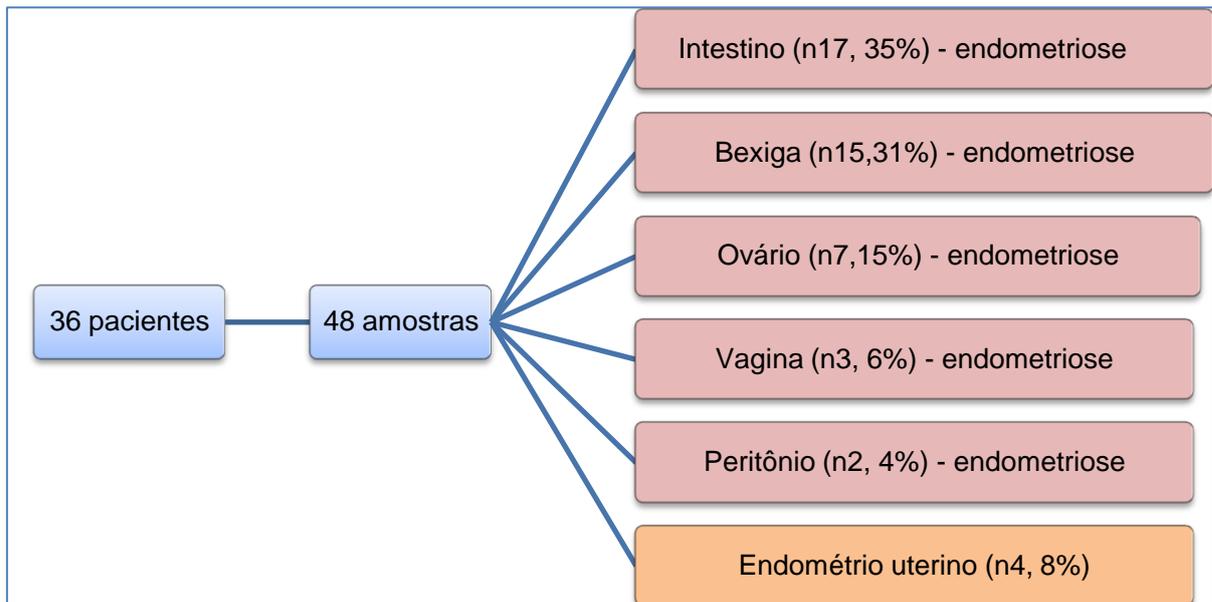


HE: coloração com hematoxilina-eosina; IHQ: imuno-histoquímica.
Fonte: da autora.

Essas 48 amostras de tecidos que foram submetidas à IHQ eram originais de seis sítios anatômicos e foram assim distribuídas: intestino (n17, 35%); bexiga (n15, 31%); ovário (n7; 15%); vagina (n3, 6%); peritônio (n2, 4%) e endométrio uterino (n4, 8%) (FIG. 4).

⁶ Aqueles blocos de parafina do arquivo deste serviço disponíveis para pesquisa.

Figura 4 - Distribuição anatômica das 48 amostras



Fonte: da autora.

4.3 Pacientes e dados analisados

Foram selecionadas 36 pacientes operadas no Biocor Instituto. Elas tiveram o diagnóstico cirúrgico de endometriose pélvica por meio de videolaparoscopia confirmada pela histologia conforme critérios já estabelecidos pelo Setor de Anatomia Patológica do Biocor Instituto. Concordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE B).

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE 41327014.5.0000.5149) (ANEXO B).

Os dados clínicos incorporados ao estudo foram: idade, queixa e tipos de dor pélvica (dismenorreia, DPC⁷, dispareunia, disquesia, disúria), percepção de flatulência abdominal, infertilidade, tratamento hormonal e/ou uso de anticoncepcional oral (ACO), atual ou até três meses antes da cirurgia, e histórico de operações prévias para tratamento de endometriose. Foi registrado o índice de massa corporal (IMC) e subdividido nas categorias de IMC baixo (< 18,5 kg/m²), normal (de 18,5 a 24,9

⁷ DPC: dor pélvica crônica, ou seja, dor no abdome inferior, não cíclica, que perdura há mais de seis meses.

kg/m²), sobrepeso (de 25,0 a 29,9 kg/m²) e obesidade (>30,0 kg/m²)⁸. Do exame ginecológico foi anotado o achado no toque vaginal normal ou alterado. Era considerado toque vaginal alterado se havia a percepção de irregularidades, de endurecimentos ou enrijecimentos, de nódulos ou massas no fundo de saco vaginal, na região retrouterina, retrocervical e em fossas ilíacas ou anexiais, isolados ou em associações (QUADRO 3).

Os dados bioquímicos estudados foram os resultados de exames de titulações séricas de CA125 e de vitamina D encontrados nos prontuários e registrado se eram normais ou alterados. Foram consideradas CA125 anormal titulações acima de 35 U/mL e de vitamina D abaixo de 30 ng/mL (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA – SBPC, 2019).

4.4 Dados cirúrgicos analisados

Os dados cirúrgicos foram obtidos nas descrições cirúrgicas dos prontuários que incluem os achados e procedimentos operatórios executados durante a videolaparoscopia.

A videolaparoscopia era realizada sob anestesia geral. Inicialmente era feita uma inspeção detalhada da pelve e abdome no sentido horário, observando todos os órgão intra-abdominais e pélvicos, tais como os cólons e retossigmoide, apêndice cecal, delgados, fígado e vesícula biliar, cúpulas diafragmáticas, toda a superfície peritoneal parietal e seus recessos, o útero, os anexos uterinos e seus ligamentos, os espaços ou compartimentos anterior e posterior da pelve, buscando averiguar a existência de aderências, tumores e todos os tipos de lesões endometrióticas e, assim, concluir o estágio da doença conforme classificação da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (*AMERICAN SOCIETY FOR reproductive medicine – rasm*, 1997) em Mínima (I), Leve (II), Moderada(III) ou Grave (IV) .

A proposta cirúrgica para tratamento da endometriose era a ressecção de toda a doença identificada que, em geral, incluía: liberação de aderências, a ressecção e

⁸ https://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/adult_bmi/index.html

cauterização de focos peritoneais, ooforoplastias, salpingoplastias, ressecções de ligamentos infiltrados, retossigmoidectomias, apendicectomias, ressecções parciais de delgado, de parede de bexiga, de retalhos vaginais acometidos, ureterólises e neurólises. Em casos definidos, hysterectomias, salpingectomias, ooforectomias. Todo material e órgãos extraídos eram encaminhados para estudo anatomopatológico. Após a identificação do sítio anatômico de origem, esse material era colocado em uma solução de formol a 10% e enviado ao laboratório para a confecção de blocos e lâminas. A partir desses blocos foi realizada imunohistoquímica. A confirmação diagnóstica de endometriose foi feita pela identificação histológica de glândulas endometriais ou estroma fora da cavidade uterina pelo patologista.

Os dados cirúrgicos analisados foram o estágio da classificação da rASRM e a identificação dos sítios anatômicos: peritônio, ovário, intestino (retossigmoide, cólons, apêndice cecal, delgado), bexiga, vagina e endométrio uterino (QUADRO 3).

Quadro 3 - Variáveis analisadas

Gerais	Específicas
Clínicos	Idade Dor pélvica: dismenorreia, DPC ⁹ , dispareunia, disquesia, disúria, percepção de flatulência abdominal Infertilidade Tratamento hormonal e/ou uso de anticoncepcional oral Operações prévias para tratamento de endometriose
Exame físico	Índice de massa corporal: baixo (< 18,5 kg/m ²), normal (de 18,5 a 24,9 kg/m ²), sobrepeso (de 25,0 a 29,9 kg/m ²) e, obesidade (>30,0 kg/m ²). Toque vaginal: normal ou alterado.
Bioquímicos (séricos)	CA125: normal ou aumentado (>35 U/mL) Vitamina D: normal ou baixa (< 30 ng/mL)
Cirúrgicos	Classificação da rASRM: Mínima (I), Leve (II), Moderada (III) ou Grave (IV). Identificação dos sítios anatômicos: <ul style="list-style-type: none"> • Peritônio • Ovário • Intestino (retossigmoide, cólons, apêndice cecal, delgado) • Bexiga • Vagina • Endométrio uterino

Fonte: da autora.

⁹ DPC: dor pélvica crônica, ou seja, dor no abdome inferior, não cíclica, que perdura há mais de seis meses.

4.5 Critérios de inclusão

- a) Pacientes com diagnóstico cirúrgico de endometriose pélvica com confirmação histopatológica da doença pela detecção de glândulas e/ou estroma endometriais fora da cavidade uterina, operados pela autora;
- b) assinatura nos termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelas pacientes;
- c) achado de endométrio nas lâminas de hematoxilina-eosina.

4.6 Critérios de exclusão

- a) Pacientes que estivessem com prontuário incompleto;
- b) casos em que a autora não era a médica responsável pela paciente.

4.7 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica (IHQ) foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Setor de Anatomia Patológica e Medicina Legal da FM-UFMG por único examinador.

Foram realizados cortes em lâminas silanizadas e coradas primeiramente com hematoxilina e eosina (HE) para selecionar aquelas com endométrio. Apenas as amostras com endométrio foram então submetidas à IHQ. Foi utilizada no preparo das lâminas a técnica de *tissue microarray*: inicialmente, foi montado um bloco parafinado com fragmentos de 11 pacientes e um fragmento de controle, o qual demarca a ordem dos demais fragmentos. O bloco é cortado no micrótomo com espessura de 4 µm. Esse bloco tem como objetivo visualizar todos os 11 pacientes em uma só lâmina, a fim de economizar reagentes, reduzir os custos e a variabilidade dos resultados

A técnica da IHQ iniciou-se com o processo de desparafinizar e reidratadar as lâminas com xilol e álcool etílico 100 e 80%. A recuperação antigênica foi induzida pelo calor e foram realizados os bloqueios da peroxidase endógena com a solução

de bloqueio da peroxidase do NOVOLINK e o bloqueio das proteínas com solução de bloqueio de proteínas do NOVOLINK. Após aplicação dos anticorpos primários diluídos (anticlaudin 3, ac. policlonal de coelho, marca ABCAM, AB15102 da Biogen e, anticlaudin 4 antibody EPRR17575, ABCAM, AB210796, da Biogen) foi adicionada a solução de bloqueio pós-primário do NOVOLINK. A reação do anticorpo secundário foi feita com a solução do polímero NOVOLINK, incubada em temperatura ambiente e lavada com *phosphate buffered saline* (PBS).

O preparo do sistema de detecção foi com o cromógeno DAB e, finalmente, a contracoloração foi feita com hematoxilina (QUADRO 4). O controle positivo foi realizado com tecido do fígado no citrato (CLDN-3 diluição 1:300 e CLDN-4 1:200) e o negativo foi a lâmina sem anticorpo. O polímero utilizado foi o NOVOLINK da Leica e o tampão foi o TRIS (ph7.6). A leitura foi efetuada no microscópio *Olympus* utilizando a lente de 10x para localização e a de 40x para análise final da IHQ. A técnica passo a passo encontra-se no APÊNDICE C.

A reação das claudinas aparecia em marrom contrastando com o fundo azul da coloração da lâmina (FIG. 5). A expressão foi considerada presente (+) ou ausente (-) e a intensidade da expressão foi classificada de acordo com o número de células marcada, obtendo-se, assim, em três categorias seguintes, ilustradas na FIG. 6) :

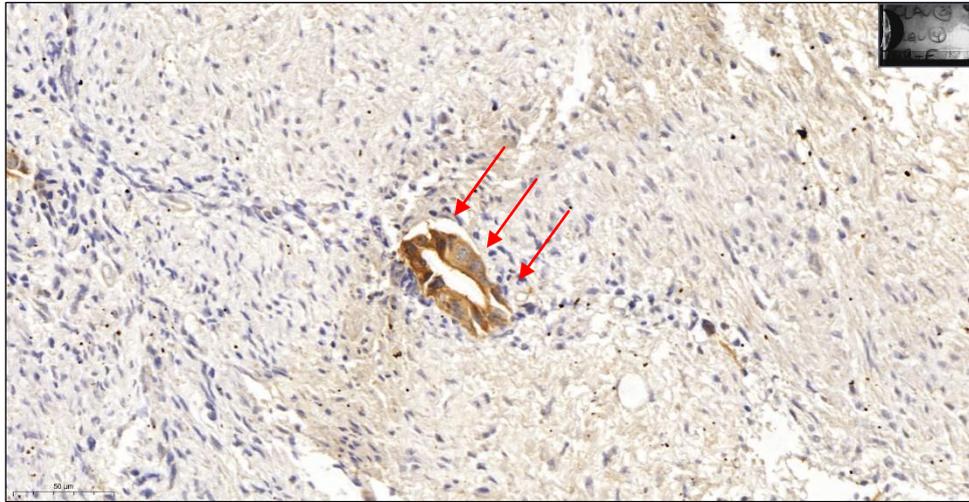
- a) Fraca (+): até 25% das células marcadas;
- b) moderada (++) : até 50% das células marcadas;
- c) forte (+++ e ++++): sendo três cruzes até 75% e quatro cruzes até 100% das células marcadas.

Quadro 4 - Anticorpos primários, secundários e metodologia usada no estudo imuno-histoquímico

Anticorpo Primário	Diluição	Anticorpo Secundário	Recuperação	Cromógeno
CLDN-3 policlonal Invitrogen 341700	1:100	Kit HiDef Polímero Cell Marque 454D	<i>Trilogy</i> 920P em panela pressurizada 117° C	Kit DAB Cell Marque 957-D
CLDN-4 43E2C1 Invitrogen 329400	1:50	Kit HiDef Polímero Cell Marque 454D	<i>Trilogy</i> 920P em panela pressurizada 117°C	Kit DAB Cell Marque 957-D

Fonte: da autora.

Figura 5 - Fotografia da lâmina de imuno-histoquímica



Claudina em marrom contrastando com o fundo azul da coloração da lâmina (40x) (setas vermelhas)

Fonte: da autora (bloco 9F).

Figura 6 - Fotografias das lâminas de imuno-histoquímica com as classificações da intensidade de expressão das claudinas

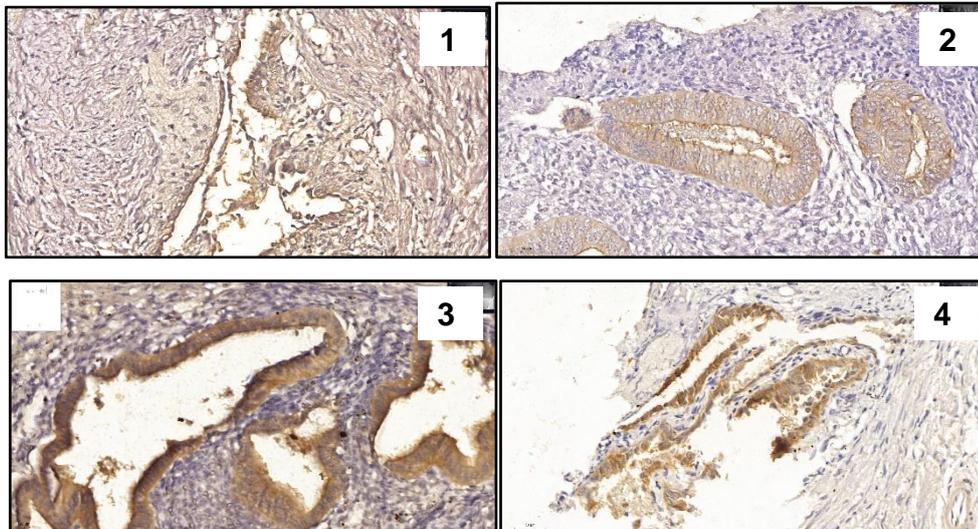


Foto 1: intensidade fraca (+); Foto 2: intensidade moderada (++); Foto 3: intensidade forte (+++); Foto 4: intensidade forte (++++).

Fonte: da autora (blocos 14A,16A,1E e 9F).

4.8 Padrões de expressão das claudinas na doença multifocal

Entre as 36 pacientes, nove delas forneceram amostras em mais de um sítio anatômico, possibilitando analisar qual o padrão da expressão das claudinas numa doença multifocal em uma mesma paciente. Dessas nove pacientes, seis tiveram

amostras de dois sítios e as demais de três sítios anatômicos, conforme descritos na TAB. 1.

As combinações de expressão das CLDN-3 e CLDN-4 num mesmo sítio anatômico foram assim classificadas:

(++): se as duas claudinas estavam presentes simultaneamente;

(-) : se ambas estavam ausentes;

(+3) se apenas a claudina 3 estava presente; e,

(+4) quando apenas a claudina 4 estava presente.

Os padrões de expressão das claudinas foram considerados: homogêneos se as claudinas se expressavam igualmente nos diferentes sítios; ou heterogêneos se as expressões variavam nos diferentes sítios anatômicos, em uma mesma paciente.

Tabela 1 - Casos de doença multifocal

Paciente	Amostras	
	N	Sítio Anatômico
1	2	Bexiga e vagina
2	2	Intestino e ovário
3	2	Intestino e ovário
4	2	Intestino e ovário
5	2	Intestino e ovário
6	2	Bexiga e intestino
7	3	Bexiga, intestino e ovário
8	3	Bexiga, intestino e ovário
9	3	Intestino, vagina e endométrio

4.9 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram descritas por meio da média \pm desvio-padrão. Quando tinham distribuição normal, foram verificadas pelo teste de normalidade Shapiro Wilk.

As variáveis qualitativas ou categóricas foram descritas pelas frequências absoluta e porcentagem.

Nas análises de associação das variáveis categóricas foram realizados os testes qui-quadrado de Pearson assintótico (quando 20% do valor esperado eram inferiores a cinco e 80% do valor esperado superior a cinco) e o teste qui-quadrado de Pearson exato (quando mais de 20% do valor esperado eram inferiores a cinco). A partir do teste qui-quadrado significativo no nível de 0,05 foi analisado o valor do resíduo padronizado, a diferença significativa foi encontrada quando o resíduo foi $\leq -1,96$ e $\geq +1,96$.

Nas comparações específicas entre grupos foi utilizado o teste Z de proporção (*Two Proporticon Z-test*). O nível de significância utilizado foi de 0,05. Esse teste é utilizado para testar se há diferença entre duas proporções. A hipótese nula para o teste era que as proporções fossem as mesmas, e a hipótese alternativa é que as proporções não fossem as mesmas. Foi utilizado para comparar as proporções de cada sítio anatômico diferente.

As análises estatísticas foram realizadas nos *softwares Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versão 20.0 e Stata versão 9.1*.

5 RESULTADOS

5.1 Características clínicas, bioquímicas e cirúrgicas das pacientes

As pacientes tinham média de idade de 35 anos, variando de 21 a 46 anos, sendo 13,9% delas com menos de 31 anos e 50,0% acima dos 36 anos; 72,2% delas eram inférteis. A dismenorreia foi o tipo de dor pélvica mais frequente, presente em 97,2% delas, seguido pela DPC (55,6%), pela disquesia (55,6%) e pela dispareunia (44,4%). Foram obtidas 22 amostras (61,1%) de pacientes que fizeram uso de tratamento hormonal e/ou uso de anticoncepcional oral (ACO) antes das operações e 19 (38,9%) eram amostras de pacientes que não usaram. O percentual de 41,7% delas já tinha sido submetido a tratamentos cirúrgicos prévios (TAB. 2).

No exame físico, as pacientes apresentaram a média índice de massa corporal (IMC) de $22,89 + 3,66 \text{ kg/m}^2$, sendo que a maioria delas (68,8%) tinha IMC baixo e normal, 31,2% apresentavam sobrepeso e apenas um caso com obesidade. Ao exame ginecológico, o toque vaginal encontrava-se alterado em 75,1% dos casos (TAB. 2).

Titulações séricas de CA125 foram feitas por 35 pacientes, sendo que 71,4% delas tiveram resultados anormais, ou seja, acima de 35 U/mL, que variaram de 39,5 a 482 U/mL. Titulações séricas de vitamina D foram feitas por 14 pacientes, 71,4% tiveram titulações abaixo de 30 ng/mL, variando de 17,2 a 29,9 ng/mL.

Em relação ao estadiamento, conforme proposto pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (rASRM, 1997), 80,6% dos casos eram doenças avançadas, englobando os estádios moderado (III) e grave (IV) (TAB. 2).

Tabela 2 - Variáveis clínicas, bioquímicas e cirúrgicas das 36 pacientes

Variáveis	Frequência		
	N	%	
Sintomas	Infertilidade	26	72,2
	Dismenorreia	35	97,2
	DPC***	20	55,6
	Dispareunia	16	44,4
	Disquesia	20	55,6
	Flatulência abdominal	19	52,8
	Disúria	15	41,7
Uso de hormônio pré-operatório	Sim	22	61,1
	Não	19	38,9
Operações prévias para tratamento de endometriose	1 operação	12	33,3
	2 operações	2	5,6
	> 3 operações	1	2,8
	Total	15	41,7
IMC*	Baixo (< 18,5 kg/m ²)	3	9,4
	Normal (18,5 a 24,9 kg/m ²)	19	59,4
	Sobrepeso (25 a 29,9 kg/m ²)	9	28,1
	Obesidade (>30 kg/m ²)	1	3,1
Exame ginecológico	Toque vaginal com achados anormais****	25	75,1
Titulações séricas alteradas	CA-125 (> 35 U/mL)	25	71,4
	Vitamina D (< 30 ng/mL)	10	71,4
Classificação da rASRM**	Estádio I - Mínima	0	0,0
	Estádio II - Leve	7	19,4
	Estádio III - Moderada	4	11,1
	Estádio IV - Grave	25	69,4

(*) IMC: índice de massa corporal. (**) rASRM: *Revised ASRM Classification of Endometriosis*. (***)DCP: dor pélvica crônica; (****)Toque vaginal com percepção de irregularidades, de endurecimentos, de nódulos ou massas no fundo de saco vaginal, na região retrouterina, retrocervical e em fossas ilíacas ou anexiais, isolados ou em associações.

5.2 Expressão das claudinas em todas as amostras

Na amostra total de 78 lâminas de IHQ foi achado a expressão da CLDN-3 em 34 (43,6%) amostras e da CLDN-4 em 60 (76,9%) delas. O estudo progrediu para analisar o padrão de expressão dessas claudinas apenas nas 48 amostras que tiveram identificação dos sítios anatômicos originais e dados dos prontuários completos conforme figuras 3 e 4. A proporções de expressão dessas claudinas foi semelhante nessas duas amostras (Apêndice D).

Nas 48 amostras analisados, foi observada a expressão da CLDN-3 em 58,3% delas e da CLDN-4 em 85,4% (TAB. 3).

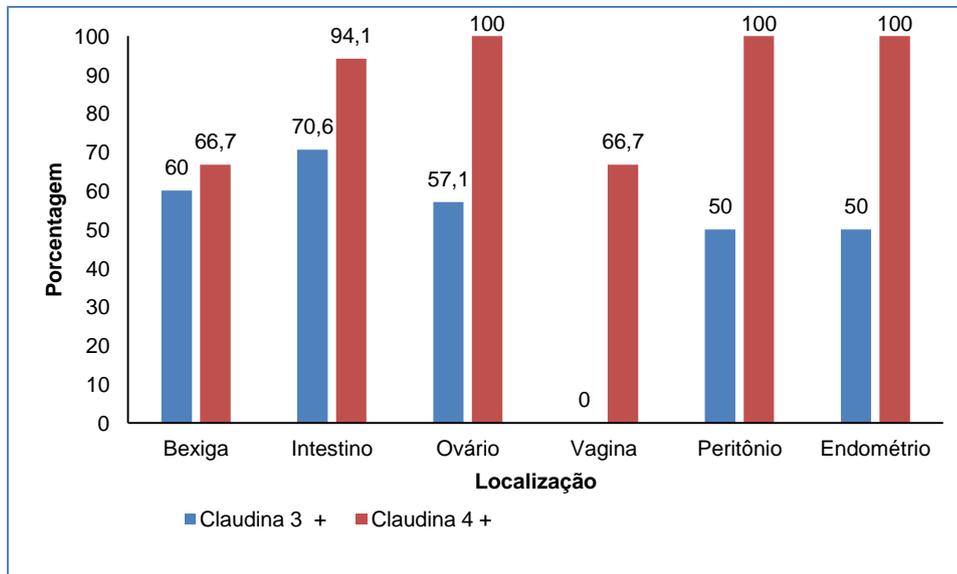
Observou-se expressão de ambas as claudinas em todos os seis sítios anatômicos, em proporções variáveis, com exceção da expressão da CLDN 3 na vagina (GRÁF. 1).

Tabela 3 - Expressão de CLDN-3 e CLDN-4 em 48 amostras de endometriose e endométrio uterino conforme sítios anatômicos

Sítio	n	CLDN-3 n (%)		p	CLDN-4 n (%)		p
		(-)	(+)		(-)	(+)	
Intestino	17	5 (29,4)	12 (70,6)	0,016	1 (5,9)	16 (94,1)	0,000
Bexiga	15	6 (40,0)	9 (60,0)	0,273	5 (33,3)	10 (66,7)	0,067
Vagina	3	3 (100,0)	0 (0,0)	-	1 (33,3)	2 (66,7)	0,413
Ovário	7	3 (42,9)	4 (57,1)	0,595	0 (0,0)	7 (100,0)	-
Peritônio	2	1(50,0)	1(50,0)	-	0 (0,0)	2 (100,0)	-
Endométrio	4	2 (50,0)	2 (50,0)	-	0 (0,0)	4 (100,0)	-
Total	48	20(41,7)	28 (58,3)	0,104	7 (14,6)	41 (85,4)	0,000

p: comparação da CLDN-3 ou CLDN-4 para cada sítio.

Gráfico 1 - Expressão de CLDN-3 e CLDN-4 em 48 amostras de endometriose e endométrio uterino conforme sítios anatômicos



5.3 Expressão das claudinas na endometriose profunda

Foi considerada endometriose profunda (EP) o conjunto daquelas amostras de origem intestinal, da bexiga e da vagina, perfazendo um grupo de 35 (72,9%) amostras entre as 48 estudadas.

Nesse grupo (EP) foram verificadas positivities das expressões da CLDN-3 em 60% das amostras e da CLDN-4 em 80% delas, com destaque para a positividade de expressão da CLDN-4, que mostrou significância estatística ($p=0,000$), conforme pode ser visto na TAB. 4.

Na endometriose profunda intestinal foi demonstrado maior frequência da expressão tanto de CLDN-3 ($p=0,016$) quanto de CLDN-4 ($p=0,000$), diferindo dos demais sítios, de acordo com a TAB. 4.

Tabela 4 - Expressão da CLDN-3 e da CLDN-4 em 35 amostras de endometriose profunda

Sítio	n	CLDN-3			CLDN-4		
		n(%)		p	n(%)		p
		(-)	(+)		(-)	(+)	
Intestino	17	5 (29,4)	12 (70,6)	0,016	1 (5,9)	16 (94,1)	0,000
Bexiga	15	6 (40,0)	9 (60,0)	0,273	5 (33,3)	10 (66,7)	0,067
Vagina	3	3 (100,0)	0 (0,0)	-	1 (33,3)	2 (66,7)	0,413
Endometriose profunda (intestino + bexiga + vagina)	35	14(40,0)	21(60,0)	0,094	7(20,0)	28(80,0)	0,000

p: comparação da CDLN-3 ou CDLN-4 para cada sítio (teste Z de proporção ou "Two Proporticon Z-test").

5.4 Intensidade de expressão de CLDN-3 e CLDN-4

A intensidade da expressão dessas claudinas nas amostras foi classificada em fraca (+), moderada (++) e forte (\geq +++). Nas TAB. 5 e 6 pode ser visto que na soma total dos sítios predominou uma expressão de intensidade fraca, tanto da CLDN- 3 (75,4%) quanto da CLDN- 4 (73,8%), respectivamente.

Na análise geral pelo teste do qui-quadrado de Pearson Exato, comparando todos os sítios com todas as intensidades das expressões das claudinas, foi demonstrado que não ocorreu associação de sítios anatômicos específicos com as intensidades das expressões de CLDN-3 ($p=1,000$) e CLDN-4 ($p=0,132$), como mostram as TAB. 5 e 6, respectivamente.

Na análise específica das três intensidades das expressões das claudinas em cada sítio anatômico isoladamente foi evidenciado que na EP predominava a intensidade fraca das expressões das duas claudinas. Foi utilizando o teste Z de proporção para conferir essa significância estatística (TAB. 5 e 6).

Tabela 5 - Intensidade da expressão da CLDN-3 nos diferentes sítios anatômicos

Sítio Anatômico	Intensidade de Expressão da CLDN-3				Teste Z	Teste qui-quadrado de Pearson Exato
	N	Fraca (+)	Moderada (++)	Forte ($\geq+++$)		
Endometriose profunda	21	15(71,4)	3(14,3)	3(14,3)	$p=0,000$	$p=1,000$
Ovário	4	3(75,0)	1(25,0)	0(0,0)	$p=0,157$	
Peritônio	1	1(100,0)	0(0,0)	0(0,0)		
Endométrio	2	2(100,0)	0(0,0)	0(0,0)		
Total	28	21(75,3)	4(14,3)	3(10,7)	$p=0,000$	

O teste Z de proporção compara entre as intensidades leve/moderada/forte para cada sítio. O p demonstrado diz respeito à intensidade fraca *versus* as demais.

O teste qui-quadrado de Pearson exato faz a análise geral e compara todos os sítios com todas as intensidades.

Tabela 6 - Intensidade da expressão da CLDN-4 nos diferentes sítios anatômicos

Sítio Anatômico	Intensidade de Expressão da CLDN-4				Teste Z	Teste qui-quadrado de Pearson Exato
	N	Fraca (+)	Moderada (++)	Forte ($\geq+++$)		
Endometriose profunda	29	21(72,4)	5(17,2)	3(10,4)	$p=0,000$	$p=0,132$
Ovário	7	7(100,0)	0(0,0)	0(0,0)		
Peritônio	2	1(50,0)	0(0,0)	1(50,0)		
Endométrio	4	2(50,0)	2(50,0)	0(0,0)		
Total	42	31(73,8)	7(16,7)	4(9,5)	$p=0,000$	

O teste Z de proporção compara entre as intensidades leve/moderada/forte para cada sítio. O p demonstrado diz respeito à intensidade fraca *versus* as demais.

O teste qui-quadrado de Pearson Exato faz a análise geral, compara todos os sítios com todas as intensidades.

5.5 Fatores clínicos, bioquímicos e cirúrgicos *versus* a expressão das claudinas

Foi pesquisado se haveria alguma associação das expressões das claudinas 3 e 4 com os sintomas de infertilidade, com os tipos de dor pélvica, com o uso de hormônio pré-operatório, com o índice de massa corporal das pacientes, com a titulação sérica de CA-125 e vitamina D e com a extensão da doença de acordo com o estágio rASRM.

Não foi observada associação entre os sintomas (infertilidade, dismenorreia, DPC, dispareunia, disquesia, flatulência ou disúria) e a expressão das CLDN-3 e CLDN-4 nem com o uso de hormônios no pré-operatório. O IMC e as concentrações séricas de CA125 e vitamina D também não se associaram à expressão das referidas claudinas (TAB. 7).

A extensão da doença, avaliada pelo estágio rASRM, foi fator associado à expressão da CLDN-3 quando numa análise global (TAB. 7).

Ao comparar as expressões das claudinas para cada estágio, utilizando o teste Z de proporção (TAB. 8), foram identificadas diferenças nos estádios moderado e grave na expressão de CLDN-3, sendo a positividade de expressão mais frequentes no estágio grave (68,6%, $p=0,002$) e a ausência de expressão mais frequente no estágio moderado (83,3%, $p=0,021$). No estágio leve não se verificou diferença de expressão ($p=0,595$). Portanto, a CLDN-3 predominou no estágio mais avançado da doença, o grave.

Quanto à comparação da expressão da CLDN-4 para cada estágio, os resultados são contraditórios, pois se apurou essa claudina mais presente tanto no estágio leve ($p=0,008$) quanto no grave ($p=0,000$), sem diferença de expressão ($p=0,247$) no estágio moderado.

Tabela 7 - Variáveis clínicas, bioquímicas e cirúrgicas relacionados às expressões da CLDN-3 e da CLDN-4 nas 48 amostras de endometriose e endométrio de 36 pacientes operadas no Biocor Instituto

Variável		N	Expressão de CLDN-3 Valor p	Expressão de CLDN-4 Valor p
Sintomas	Infertilidade (sim/não)	36/3	0,243	1,000
	Dismenorreia (sim/não)	46/2	1,000	1,000
	DPC (sim/não)	26/22	0,624	0,687
	Dispareunia (sim/não)	23/25	0,353	0,419
	Disquesia (sim/não)	26/22	0,922	0,687
	Flatulência (sim/não)	27/21	0,184	1,000
	Disúria (sim/não)	23/25	0,732	0,237
Uso de hormônio (sem/com)		19/29	0,212	1,00
IMC		43	0,763	0,773
Titulações séricas	Vitamina D (baixa/normal)	9/5	1,000	1,000
	CA-125 (normal/aumentado)	10/25	1,000	0,128
Estádio rASRM		48	0,048	0,439

Valor p calculado pelo teste qui-quadrado de Pearson Exato para cada variável separadamente.

Tabela 8 - Expressão da CLDN-3 e da CLDN-4 nas amostras de endometriose e endométrio em relação ao estágio da endometriose

Estádio rASRM	N	CLDN-3			CLDN-4		
		(-)	(+)	p	(-)	(+)	p
Leve	7	4(57,1)	3(42,9)	0,595	1(14,3)	6(85,7)	0,008
Moderada	6	5(83,3)**	1(16,7)*	0,021	2(33,3)	4(66,7)	0,247
Grave	35	11(31,4)*	24(68,6)**	0,002	4(11,4)	31(88,6)	0,000

p calculado pelo teste Z de proporção comparando expressão das claudinas em cada estágio.

*resíduo ajustado $\leq -1,96$ e **resíduo ajustado $\geq +1,96$ pelo qui-quadrado de Pearson Exato

5.6 Expressão das claudinas em pacientes com doença multifocal

Foram nove os pacientes que forneceram amostras em mais de um sítio anatômico (TAB. 1), possibilitando analisar qual o padrão da expressão das claudinas, homogêneo (igual) ou heterogêneo (variável), numa doença multifocal em uma mesma paciente.

A expressão das claudinas foi homogênea em cinco pacientes (55,6%), enquanto nas outras quatro (44,4%) o padrão foi heterogêneo (TAB. 9). Dessa forma, não foi possível identificar um padrão de expressão em casos de doença multifocal.

Tabela 9 - Análise dos padrões de expressão combinada de CLDN-3 e CLDN-4 em sítios diferentes conforme pacientes

Paciente	No de Sítios	Tipos de Expressão das CLDN-3/CLDN-4 (1)					Semelhança da expressão das claudinas nos diferentes sítios	Semelhança (%)	Padrão da doença multifocal
		Bexiga	Intestino	Vagina	Ovário	Endométrio			
1	2	+3		+4			Variável	0	Heterogêneo
2	2		+4		+4		Igual	100	Homogêneo
3	2		++		++		Igual	100	Homogêneo
4	2		++		+4		Variável	0	Heterogêneo
5	2		++		++		Igual	100	Homogêneo
6	2	++	++				Igual	100	Homogêneo
7	3	(-)	++		++		Variável	70	Heterogêneo
8	3	++	++		++		Igual	100	Homogêneo
9	3		+4	(-)		+4	Variável	70	Heterogêneo

(1) Legenda dos tipos de expressão das CLDN-3/CLDN-4: ++: as CLDN-3 e CLDN-4 estão presentes no mesmo sítio, simultaneamente; (-): as CLDN-3 e CLDN-4 estão ausentes no mesmo sítio; +3 : apenas a CLDN-3 está presente; +4 : apenas a CLDN-4 está presente.

Em suma, podem-se destacar os resultados descritos a seguir.

As claudinas 3 e 4 expressaram-se na endometriose profunda com destaque para o sítio intestinal onde as claudinas tiveram positividade de expressão com significância estatística em comparação aos demais sítios anatômicos avaliados: CLDN-3 (p 0,016) e CLDN-4(p 0,000).

Na maioria dos sítios anatômicos predominou uma expressão de intensidade fraca, tanto da CLDN- 3 (75,4%) quanto da CLDN- 4 (73,8%). Na endometriose profunda predominou a intensidade fraca das expressões das CLND-3 (71,4%; p 0,000) e CLDN-4 (72,4%; p 0,000).

Os sintomas de infertilidade e os tipos de dor pélvica, o uso pré-operatório de hormônios, o IMC e as titulações séricas de vitamina D e CA-125 não mostraram

associação com a expressão das claudinas. A extensão da doença foi fator associado à expressão da CLDN-3, pois o estágio grave mostrou mais positividade de expressão desta claudina.

Não houve um padrão único de expressão de claudinas na doença multifocal em uma mesma paciente.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado pela primeira vez, até onde se sabe, a evidência da expressão das CLDN-3 e CLDN-4 na endometriose profunda (bexiga, intestino e vagina) (GRÁF. 1). Estudos anteriores identificaram essas claudinas apenas na endometriose ovariana e peritoneal (GAETJE *et al.*, 2008; PAN *et al.*, 2009; PAN; WENG; WANG, 2008; SOHLER *et al.*, 2013). Outras claudinas (CLDN-7 e CLDN-11) foram reconhecidas há pouco tempo na endometriose profunda (HORNÉ *et al.*, 2018).

As CLDN-3 e CLDN-4 estavam presentes em 60 e 80% das amostras de endometriose profunda, respectivamente. A CLDN-3 não foi expressada na endometriose profunda vaginal, o que pode estar relacionado à pequena amostragem deste sítio anatômico (n 3, 6%) (TAB. 4).

O local de maior expressão das claudinas na endometriose profunda foi no sítio intestinal (TAB. 4). Segundo Garcia-Hernandez, Quiros e Nusrat (2017), as claudinas apresentam diferentes padrões de distribuição e expressão ao longo do intestino. Estudos sobre a distribuição das claudinas revelaram que a CLDN-3 e a CLDN-4 apresentam expressão aumentada no cólon distal. Aparentemente, alterações na distribuição e expressão das claudinas no intestino podem resultar no aumento da absorção de macromoléculas, o que, por sua vez, induz alterações inflamatórias. Várias doenças intestinais estão associadas a esse tipo de alteração e consequente inflamação intestinal. Há relatos de redução na expressão das claudinas 3 e 4 (*downregulation*) na colite ulcerativa, síndrome do intestino irritável e doença de Crohn (BARMAYER; SCHULZKE; FROMM, 2015).

Sendo a endometriose uma doença inflamatória, as alterações observadas, principalmente da CLDN-4 no intestino, pode ser fator contribuinte para o desenvolvimento da doença. O papel da CLDN-3 nas doenças intestinais ainda não foi completamente esclarecido. Essa claudina apresenta expressão mais elevada no cólon do que no resto do intestino e é considerada uma proteína de barreira, ao passo que a CLDN-4 depende das demais claudinas para desempenhar sua função

de controle de passagem de moléculas (GARCIA-HERNANDEZ; QUIROS; NUSRAT, 2017).

Embora a CLDN-4 possa ser encontrada no intestino, o preparo do material para IHQ com utilização de arranjos em matriz das amostras teciduais (*tissue microarray* - TMA), técnica mundialmente reconhecida para análise de múltiplas amostras, com inclusão apenas de amostras comprovadamente com lesão endometrial, assegura a marcação da molécula na lesão da endometriose intestinal e sugere um possível papel na patogênese da doença. A técnica TMA permite análise de múltiplas amostras com alto rendimento, redução da variabilidade experimental e dos artefatos técnicos (KAMPF *et al.*, 2012).

Na avaliação da intensidade da expressão das CLDN-3 e CLDN-4 na endometriose profunda, ambas as claudinas apresentaram expressão fraca. Os demais sítios de endometriose igualmente tiveram expressão tênue (TAB. 5 e 6). Esses achados vão ao encontro dos resultados de estudos previamente publicados sobre a endometriose em outras localizações. Pan, Weng e Wang (2008) descreveram a expressão fraca da CLDN-4 no endometrioma ovariano comparada ao endométrio. Gaetje *et al.* (2008) relataram fraca expressão das CLDN-3 e CLDN-4 na endometriose peritoneal. Posteriormente, Pan *et al.* (2009) identificaram expressão fraca das duas claudinas, CLDN-3 e CLDN-4, no endometrioma ovariano quando comparada ao endométrio uterino. Esses dados são contrários àqueles observados no adenocarcinoma endometrial e na hiperplasia endometrial com atipias que tiveram expressão forte das CLDN-3 e CLDN-4 (PAN *et al.*, 2007). Outras claudinas também se expressaram fortemente em outras malignidades, por exemplo, a CLDN-1 no câncer de cólon, a CLDN-2 na metástase do câncer de mama no fígado e a CLDN-7 no câncer de ovário (SINGH; DHAWNA; 2015). Assim, o presente estudo, em conjunto com a literatura, sugere que o padrão de expressão das claudinas na endometriose (intensidade fraca) é diferente do padrão na malignidade (intensidade forte).

As claudinas são componentes fundamentais das junções estreitas (JE), exercem papel na manutenção da polaridade celular e na permeabilidade do tecido, especialmente de íons. Modulações nas JEs podem estar associadas a gênese e

invasão de tumores. Como a endometriose, a semelhança de neoplasias manifesta comportamento de proliferação e crescimento, sendo possível que as claudinas estejam envolvidas na patogênese da doença. Ainda não está esclarecido o papel exato das claudinas na remodelação tissular, processo este associado a várias doenças, inclusive endometriose (GAETJE *et al.*, 2008). Segundo Pan *et al.* (2009), a expressão fraca de CLDN-3 e CLDN-4 no endometrioma ovariano pode estar relacionada à formação da endometriose. Essa menor expressão de CLDN-3 e CLDN-4 na endometriose ovariana do que no endométrio eutópico traduz uma alteração da propriedade da JE, perda de claudinas, o que possivelmente seria um fator favorável à invasão endometrial e crescimento dos implantes endometrióticos.

No presente estudo a expressão das CLDN-3 e CLDN-4 não mostrou associação com os sintomas de infertilidade e dor pélvica, não sofreu influência se a paciente estivesse com (n 29) ou sem (n19) tratamento hormonal pré-operatório (p 0,212; p 1,00). Na literatura, Gaetje *et al.* (2008), estudando a expressão de genes (RNAm) e das proteínas (IHQ) de várias claudinas (CLDNs 1,3,4,5 3 7) no endométrio uterino e na endometriose peritoneal, mostraram que, embora os genes da claudina tivessem expressão maior na fase secretora endometrial, não se verificou variação das claudinas conforme a fase do ciclo menstrual nem com o uso de anticoncepcional hormonal.

Posteriormente, Pan *et al.* (2009) reforçaram essas informações. Eles reforçaram que não há variação da expressão das CLDNs 3 e 4 conforme a fase do ciclo endometrial, seja proliferativo ou secretor. Embora a endometriose cresça sob influência de estrogênio, as CLDN-3 e CLDN-4 não variam com a fase hormonal do ciclo, indicando o pequeno papel do estrogênio e da progesterona na regulação das junções estreitas. Sohler *et al.* (2013), estudando genes de várias claudinas, inclusive de CLDN-3 e CLDN-4, detectaram que as lesões de endometriose peritoneal não estavam sincronizadas com as fases do endométrio uterino, o que sugere que as lesões apresentam diferentes padrões de expressão gênica em relação ao endométrio uterino e à independência dessas claudinas da ação hormonal.

Foi identificado que a classificação da rASRM, a qual avalia a extensão da endometriose, estava associada à expressão da CLDN-3 ($p=0,048$), como demonstrado nas TAB. 7 e 8. Isso significa que essa claudina pode estar relacionada à progressão da doença, visto que ela apresentou positividade de expressão mais frequente no estágio mais avançado, o grave, comparada aos estádios inferiores (leve e moderado). Diferentemente, a CLDN-4 não exibiu esse padrão. Sua positividade de expressão não acompanhou a progressão dos estádios, mostrando frequência de positividade semelhante tanto no estágio leve quanto no grave. Tal evidência pode alertar para comportamentos distintos entre claudinas na evolução da endometriose.

Das pacientes da presente pesquisa, (72,2%) pacientes relataram infertilidade (TAB. 2), no entanto, não se obteve associação da infertilidade com a expressão das claudinas (TAB. 7).

Ressalta-se, entretanto, que CLDN-4 no endométrio uterino já foi relacionada à redução nas taxas de gravidez em outras pesquisas (MIKOLAJCZYK; WIRSTLEIN; SKRZYPCZAK, 2013; SERAFINI *et al.*, 2009). No estudo atual foram demonstradas CLDN-3 e CLDN-4 nas amostras de endométrio uterino (n 4) (TAB. 3), com intensidade de expressão fraca e moderada (TAB. 5 e 6). A endometriose pode levar à infertilidade por vários mecanismos, a saber: alterações anatômicas da pelve, principalmente nos estádios mais avançados, prejudicando a fecundação e transporte embrionário; diminuição da reserva ovariana impactando na quantidade e qualidade dos óvulos; e fatores imunológicos e alterações na receptividade endometrial, interferindo na nidação e desenvolvimento embrionário (PETTA; PELOGGIA; DIAS, 2015).

Serafini *et al.* (2009) estudaram a expressão da CLDN-4 no endométrio de mulheres em tratamento de infertilidade (27% delas com endometriose). Demonstraram que a expressão forte de CLDN-4 no endométrio foi associada a menor taxa de gravidez após fertilização *in vitro* (FIV) (10,5 vezes menos). Considerando que a CLDN-4 tem função reguladora da permeabilidade iônica nos poros celulares, ela está relacionada à passagem de cloro e bloqueio do sódio. Assim, uma possível explicação para a associação de expressão alta de CLDN-4 com redução das taxas

de gravidez pode ser devida à concentração adversa de cloreto, interferindo no meio extracelular endometrial e nas taxas de implantação embrionária e gravidez. Mikolajczyk, Wirstlein e Skrzypczak (2013), investigando a expressão de genes de CLDN-4 no endométrio, também acharam que altos níveis de CLDN-4 no endométrio podem desempenhar papel na infertilidade com endometriose mínima e na infertilidade idiopática.

O estudo atual, ao contrário dos anteriores, relatou que a expressão das claudinas no endométrio uterino foi de intensidade fraca e moderada, porém essa amostra foi pequena (n 4), embora constituída de pacientes inférteis com endometriose. Em conjunto, esses resultados sugerem o potencial papel das claudinas na patogênese da infertilidade em mulheres com endometriose e identificam a necessidade de mais estudos para esclarecer a questão.

Foi ainda avaliado o padrão da expressão das claudinas em amostras de diferentes sítios obtidos numa mesma paciente. Em cinco delas (55,6%) o padrão de expressão de CLDN-3 e CLDN-4 foi o mesmo em todos os sítios anatômicos, enquanto que nas outras quatro pacientes (44,4%) a expressão das claudinas foi variável em diferentes sítios. Assim, nessa amostra de nove pacientes não houve um padrão único de expressão de claudinas na doença multifocal, podendo ser variável ou igual nos diferentes sítios na mesma paciente. É possível ainda que essas diferenças possam ser atribuídas às alterações encontradas na relação entre os elementos celulares do endométrio. Sabe-se que o endométrio é regulado por fatores locais autócrinos e parácrinos secretados pelo epitélio glandular, estroma e miométrio, mas que na endometriose ocorre uma desorganização arquitetural que compromete a interação entre esses compartimentos.

Fatores como o tipo de implante, a quantidade de estroma, a extensão da fibrose, hemorragia focal, além do microambiente local podem estar associados à diferente expressão de diversas substâncias no tecido endometriótico, assim como o tipo e a atividade das lesões (ROGERS *et al.*, 2017). Na presente pesquisa, embora tenha sido incluído significativo número de amostras dos vários sítios anatômicos, essas amostras foram preparadas de modo a permitir apenas a inclusão do tecido endometrial com epitélio glandular para a realização das IHQs, restringindo outras

análises e interferências de outros tecidos porventura existentes no implante endometrial. Embora a técnica de TMA utilize quantidades mínimas de tecido (em geral, 0,6 mm diâmetro), os estudos disponíveis sugerem que os cortes têm elevado grau de representatividade tecidual quando comparada com o preparo convencional (SIMON; MIRLACHER; SAUTER, 2004). A constituição heterogênea do implante de endometriose pode eventualmente interferir na análise, mas o uso de material com endométrio ectópico confirmado reduziu essa possibilidade.

A pesquisa atual atingiu o objetivo, trazendo uma nova colaboração ao estudo da endometriose. Foi demonstrada a expressão das CLDN-3 e CLDN-4 na endometriose profunda, até então reconhecia apenas nas formas ovariana e peritoneal dessa doença. Foi comprovado que a expressão das claudinas não está associada aos sintomas de infertilidade e dor pélvica, nem ao IMC, nem ao uso de hormônios no pré-operatório. A CLDN-3 associou-se a estádios mais avançados da doença, avaliado com base na ASRM (1997).

Evidenciou-se que a intensidade da expressão da CLDN-3 e da CLDN-4 era fraca na doença profunda, e isso converge com a expressão fraca visto também nas endometrioses peritoneal e ovariana em pesquisas prévias. Deve ser considerado que a avaliação da intensidade da expressão das claudinas no estudo atual poderia ter sido mais bem analisada se tivessem sido incluídos, neste trabalho, grupos-controle, seja de pacientes sem endometriose, seja de endométrio uterino, para então relativizar melhor a intensidade dessas proteínas, o que pode vir a ser tema para estudos futuros.

Pode-se citar como limitações da presente investigação a coleta dos dados clínicos, bioquímicos e cirúrgicos em prontuários de forma retrospectiva, o que repercutiu na falta de algumas informações. Também a ausência de grupos-controle inviabilizou análises comparativas que seriam de grande importância. A análise molecular de amostras teciduais é passo fundamental para compreender as alterações biológicas que precedem ou são consequência do processo patológico. Em Oncologia, a coleta e análise dos tecidos tumorais vêm permitindo avanços fantásticos. Dessa forma, é fundamental ter bancos amostras de endométrio intrauterino de mulheres com e sem endometriose e de lesões endometrióticas, como fazem vários centros de pesquisa

no mundo (FASSBENDER *et al.*, 2014). Em nossos meios, todavia, há alguns entraves éticos na obtenção desse tipo de material, principalmente de amostras endometriais de mulheres saudáveis e na construção de bancos de amostras teciduais, o que representa significativo entrave em nosso estudo.

A compreensão da etiologia e fisiopatologia da endometriose ainda está permeada por muitas dúvidas, apesar da grande quantidade de estudos e de avanços recentes nas pesquisas. O achado da expressão das CLDN-3 e CLDN-4 na endometriose profunda pode ser ponto de partida para o aprofundamento da avaliação dessas substâncias na endometriose em busca de novas perspectivas no campo da fisiopatologia e de marcadores da gravidade da endometriose visto pela associação com a extensão da doença. Obviamente, antes de qualquer conclusão, serão necessários estudos controlados *in vitro* e *in vivo* em larga escala que consigam desvendar adequadamente o papel das claudinas na endometriose.

7 CONCLUSÃO

Foi evidenciado que as CLDN-3 e CLND-4 estavam presentes na endometriose profunda. Em todos os sítios de endometriose profunda as claudinas estudadas mostraram intensidade fraca de expressão. A expressão dessas claudinas não foi influenciada por fatores clínicos ou laboratoriais, mas foi associada à extensão da doença. Provavelmente, as claudinas estão relacionadas ao potencial de invasão e crescimento da endometriose pélvica.

REFERÊNCIAS

AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. ASRM. Revised ASRM Classification of endometriosis. 1996. **Fertil Steril**, v. 67, n. 5, p. 817-21, 1997.

BANZ, C. *et al.* The molecular signature of endometriosis-associated endometrioid ovarian cancer differs significantly from endometriosis-independent endometrioid ovarian cancer. **Fertil Steril**, v. 94, n. 4, p. 1212-7, 2010.

BARMEYER, C.; SCHULZKE, J.D.; FROMM, M. Claudin-related intestinal diseases. **Semin Cell Dev Biol**, v. 42, p. 30-8, Jun. 2015.

CORNILLIE, F.J. *et al.* Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. **Fertil Steril**, v. 5, n. 6, p. 978–83, 1990.

FASSBENDER, A. *et al.* WERF EPHeC Working Group. World Endometriosis Research Foundation Endometriosis Phenome and Biobanking Harmonisation Project: IV. Tissue collection, processing, and storage in endometriosis research. **Fertil Steril**, v. 102, n. 5, p. 1244-53, Nov. 2014.

FURUSE, M. *et al.* Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. **J Cell Biol**, v. 141, n. 7, p. 1539-50, 1998.

GAETJE, R. *et al.* Differential expression of claudins in human endometrium and endometriosis. The official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology: **Gynecol Endocrinol**, v. 24, n. 8, p. 442-9, 2008.

GARCIA-HERNANDEZ, V.; QUIROS, M.; NUSRAT, A. Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1397, n. 1, p. 66-79, Jun, 2017.

GORDTS, S.; KONINCKX, P.; BROSENS, I. Pathogenesis of deep endometriosis. **Fertil Steril**. v. 108, n. 6, p. 872-85 e1, 2017.

GRUND, S.; GRUMMER, R. Direct cell(-)cell interactions in the endometrium and in endometrial pathophysiology. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 8, 2018.

HASHIMOTO, Y.; YAGI, K.; KONDOH, M. Current progress in a second-generation claudin binder, anti-claudin antibody, for clinical applications. **Drug Discov Today**, v. 21, n. 10, p. 1711-8, 2016.

HORNÉ, F. *et al.* Impaired localization of claudin-11 in endometriotic epithelial cells compared to endometrial cells. **Reprod Sci**, p. 1933719118811643, Dec. 2018.

https://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/adult_bmi/index.html.

KAMPF, C. *et al.* Production of tissue microarrays, immunohistochemistry staining and digitalization within the human protein atlas. **J Vis Exp**, n. 63, p. 3620, 2012. Published 2012 May 31. Doi: 10.3791/3620.

KOBAYASHI, H. Invasive capacity of heterotopic endometrium. **Gynecol Obstet Invest**, v. 50 (Suppl 1), p. 26-32, 2000. Review.

KONINCKX, P.R. *et al.* Deeply infiltrating endometriosis is a disease whereas mild endometriosis could be considered a non-disease. **Ann New York Acad Sci**, v. 734, p. 333-41, 1994.

LAG-NAG, M.; MORIN, P.J. The claudins. **Genome Biol**, v. 10, n. 8, p. 235, 2009.

METTLER, L. Etiology and pathogenesis. *In*: METTLER, L. *et al.* Endometriosis: A concise practical guide to current diagnosis and treatment. **Endo: Press GmbH**, Germany, cap. 1.3, p. 15-21, 2017.

MIKOLAJCZYK, M.; WIRSTLEIN, P.; SKRZYPCZAK, J. Aberrant claudin-4 transcript levels in eutopic endometrium of women with idiopathic infertility and minimal endometriosis. **Ginekol Pol**, v. 84, n. 2, p. 90-4, 2013.

NISOLLE, M.; DONNEZ, J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. **Fertil Steril**, v. 68, n. 4, p. 585-96, 1997.

PAN, X.Y. *et al.* Altered expression of claudin-3 and claudin-4 in ectopic endometrium of women with endometriosis. **Fertil Steril**, v. 91, n. 5, p. 1692-9, 2009.

PAN, X.Y. *et al.* Expression of claudin-3 and claudin-4 in normal, hyperplastic, and malignant endometrial tissue. **Int J Gynecol Cancer**, v. 17, p. 233-241, 2007.

PAN, X.Y.; WENG, Z.P.; WANG, B. [Expression of claudin-4 in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis]. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**, v. 43, n. 6, p. 418-21, 2008.

PETTA, C.A.; PELOGGIA, A.; DIAS JR, J.A. Infertilidade. *In*: PODGAEC, S. **Coleção Endometriose**. Cap 5.1, Febrasgo, p 83-87. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ROGERS, P.A. *et al.* WES/WERF consortium for research priorities in endometriosis: Research priorities for endometriosis. **Reprod Sci**, v. 24, n. 2, p. 202-226, Feb. 2017.

SCIOSCIA, M. *et al.* Distribution of endometriotic lesions in endometriosis stage IV supports the menstrual reflux theory and requires specific preoperative assessment and therapy. **Acta Obstet Gynecol Scan**, v. 90, n. 2, p. 136-9, 2011.

SERAFIN, P.C. *et al.* Endometrial claudin-4 and leukemia inhibitory factor are associated with assisted reproduction outcome. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 7, n. 30, p. 1-9, 2009.

SIMON, R.; MIRLACHER, M.; SAUTER, G. Tissue microarrays. **BioTechniques**, v. 36, p. 98-105, 2009.

SINGH, A.B.; DHAWAN, P. Claudins and cancer: Fall of the soldiers entrusted to protect the gate and keep the barrier intact. **Semin Cell Dev Biol**, v. 42, p. 58-65, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA. MEDICINA LABORATORIAL. SBPC/ML. Disponível em: <http://www.sbpc.org.br>. Acesso em: agosto de 2019.

SOHLER, F. *et al.* Tissue remodeling and nonendometrium-like menstrual cycling are hallmarks of peritoneal endometriosis lesions. **Reprod Sci**, v. 20, n. 1, p. 85-102, 2013.

TONON, Â.F.S. **Claudina- 3 e Claudina- 4, potenciais marcadores de agressividade no carcinoma de endométrio tipo I.** Dissertação (Mestrado em Medicina) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, 2013.

VERCELLINI, P. *et al.* Deep endometriosis: Definition, pathogenesis, and clinical management. **J Am Assoc Gynecol Laparosc**, v. 11, n. 2, p. 153–161, 2004.

ANEXOS E APÊNDICES

Anexo A – Email de Grummer R permitindo utilizar a Figura 1

De: **Grümmer, Ruth** Ruth.Gruemmer@uk-essen.de 
Assunto: AW: Permission
Data: 4 de julho de 2019 10:56
Para: Ivete Pessoal ivete.avila@gmail.com

Dear Ivete de Avila,

when correctly cited, I have no objection that you show the figure in your thesis.

Best regards
Ruth Grümmer

Von: Ivete Pessoal <ivete.avila@gmail.com>
Gesendet: Donnerstag, 4. Juli 2019 14:41
An: Grümmer, Ruth <Ruth.Gruemmer@uk-essen.de>
Betreff: Permission

Dear author,

I am writing a doctoral thesis on the expression of claudinas in endometriosis in the postgraduate course in Women's Health of the Faculty of Medicine of the Federal University of Minas Gerais in Brazil.

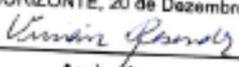
I was very interested in her publication "Direct Cell-Cell Interactions in the Endometrium" in the International Journal of Molecular Sciences in 2018. My compliments for the excellence of this publication.

I would like your permission to show your Figure 1 in my thesis, certainly showing the original reference of your work.

I await your response with great interest and thanks.

Ivete de Avila - ivete.avila@gmail.com; <http://lattes.cnpq.br/5781068010925259>
Gynecologist

Anexo B – Parecer ético

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS				
Continuação do Parecer: 1.876.026				
Recomendações: Não se aplica.				
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Somos favoráveis pela aprovação da Notificação em relação ao projeto de pesquisa intitulado: "Correlação entre classificação histológica e receptores hormonais em mulheres com endometriose.", sob a responsabilidade da pesquisadora Márcia Mendonça Carneiro.				
Considerações Finais a critério do CEP: Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).				
Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:				
Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	ProjetoClaudinaresumoPlatBr.pdf	06/12/2016 10:22:24	MÁRCIA MENDONÇA CARNEIRO	Aceito
Situação do Aprovado				
Necessita Apreciação da CONEP: Não				
BELO HORIZONTE, 20 de Dezembro de 2016  <hr style="width: 20%; margin: auto;"/> Assinado por: Vivian Resende (Coordenador)				
Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad 81 2005 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901 UF: MG Município: BELO HORIZONTE Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coop@prpq.ufmg.br				
Página 03 de 03				

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 1.678.025

pelas agências de fomento.

Objetivo da Notificação:

Identificar expressão da claudina-3 e 4 em mulheres portadoras de endometriose profunda infiltrativa (EPI) e sua correlação com a classificação histológica das lesões.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequadamente avaliados de acordo com o parecer N°982.852 datado em 12/03/2015

Segundo a pesquisadora, "A coleta de amostras de tecido endometrial intrauterino e implantes endometrióticos será feita durante a videolaparoscopia ou laparotomia sob anestesia, não causando dor ou qualquer risco adicional à paciente. Reitero que a videolaparoscopia assim como as biópsias será realizada como parte integrante do tratamento das mulheres com endometriose ou outras afeições ginecológicas benignas, independente da pesquisa. Como todo estudo prospectivo envolvendo seres humanos, o presente projeto poderá encontrar o desafio de recrutar um número adequado de pacientes no tempo previsto. Espera-se que este problema seja minimizado porque o estudo será conduzido no Ambulatório de Endometriose do Hospital das Clínicas da UFMG e na clínica ginecológica do Biocor, que recebe grande fluxo de pacientes para propedêutica e tratamento de endometriose".
E quanto aos benefícios, "É preciso ainda ressaltar a importância da realização de trabalhos deste porte, que acabam gerando publicações científicas nacionais e internacionais, além de contribuir para o esclarecimento de aspectos relevantes de uma doença tão prevalente e incapacitante como a endometriose".

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

A endometriose apresenta uma frequência de 2%, atingindo 50% em mulheres inférteis. Há controvérsias quanto à capacidade do tecido endometrial ectópico em responder às alterações cíclicas dos esteroides ovarianos e há controvérsias quanto à expressão dos receptores hormonais. Além disso, as lesões da endometriose podem ser vermelhas, brancas e pretas. Dessa maneira, o estudo em questão trará mais conhecimentos sobre esse tema

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequadamente listados de acordo com o parecer N° 982.852 datado em 12/02/2015

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 8827 2º Ad S1 2005
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4502

E-mail: coop@pqpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER DO COLEGIADO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Correlação entre classificação histológica e receptores hormonais em mulheres com endometriose

Pesquisador: MÁRCIA MENDONÇA CARNEIRO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 41327014.5.0000.5149

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da UFMG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Projeto claudina resumo PlatBr

Justificativa: O projeto foi iniciado com o recrutamento de pacientes e coleta de amostras mas

Data de Envio: 06/12/2016

Situação da Notificação: Aguardando revisão do parecer do colegiado

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.876.025

Apresentação da Notificação:

"Correlação entre classificação histológica e receptores hormonais em mulheres com endometriose."

Trata-se de um estudo retrospectivo, observacional e transversal, com 30 mulheres entre 18 e 45 anos de idade, com diagnóstico cirúrgico de endometriose pélvica com confirmação anátomo-patológica. As biópsias (já feitas por ocasião da cirurgia realizada no HC e no Bloco, e como parte da assistência às pacientes) serão avaliadas para identificar a expressão de receptores hormonais (estrogênio, progesterona, androgênio e vitamina D). As participantes serão divididas em dois grupos: 15 sem e 15 com tratamento hormonal. Há critérios de inclusão, exclusão, descrição da análise estatística, cronograma adequado e custo de R\$ 9.117,00, programando-se financiamento.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4392 E-mail: ccep@corp.ufmg.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 41327014.5.0000.5149

Interessado(a): Prof. Márcia Mendonça Carneiro
Departamento de Ginecologia e Obstetria
Faculdade de Medicina- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 20 de dezembro de 2016, a notificação do projeto de pesquisa intitulado "**Correlação entre classificação histológica e receptores hormonais em mulheres com endometriose**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.


Prof. Dra. Vivian Resende
Coordenadora do COEP-UFMG

Apêndice A - Planilha das lâminas de imuno-histoquímica

No	IDENTIFICAÇÃO BLOCO	CLDN-3	CLDN-4
1	3A	EP. ESCAMOSO	EP. ESCAMOSO
2	9C	-	++
3	1E	-	+++
4	9E	-	++
5	9A	NÃO TEM MATERIAL	NÃO TEM MATERIAL
6	7A	-	FRACO +
7	25C	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
8	19C	-	+++
9	4C	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
10	13B	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
11	9F	-	++++
12	9D	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
13	11C	-	+
14	15C	-	-
15	21C	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
16	22A	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
17	23C	-	++++
18	16A	-	++
19	46A	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
20	51C	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
21	46C	+	+
22	4A	-	+
23	36A	-	+
24	38A	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
25	41C	-	++
26	14A	-	+
27	55A	+	++
28	56B	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
29	66A	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
30	69A	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
31	67B	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
32	27A	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
33	4D	-	+
34	11D (INTESTINO)	-	EP. DO INTESTINO +
35	1C (TUBA?)	+	+
36	573/152	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
37	573/154	+	+
38	834/154	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
39	834/156	+	+
40	1086/151	+	+
41	1088/155	+	+
42	1961/15-2	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
43	1961/15-4	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
44	2824/16-3	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
45	2824/16-6	+	+

46	2847/15-1	+	+
47	2847/15-3	+	+
48	3113/15-4	-	+
49	3113/15-6	+	+
50	3125/15-4	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
51	3125/15-11	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
52	3430/15-4	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
53	3430/15-5	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
54	3430/15-6	+	+
55	4235/16-4	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
56	4235/16-5	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
57	4235/16-6	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
58	4292/16-5	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
59	4292/16-6	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
60	9537/2	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
61	1364243/3	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
62	1364243/6	-	++
63	1377911/2	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
64	1377911/5	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
65	1388429/16	-	++
66	1388429/10	+	++
67	1409537/3	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
68	1409537/4	+	+
69	1409537/7	+	+
70	1435476/3	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
71	1435476/7	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
72	1439136/4	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
73	1439136/8	+	-
74	1447190/7	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
75	1447190/9	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
76	1451671/6	+	+
77	1451671/2	+	+
78	1458650/2	-	-
79	1458650/8	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
80	1470647/1	+	+++
81	1470647/9	++	+
82	1474815/5	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
83	1474815/8	-	+
84	1516745/3	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
85	1516745/7	+	+
86	1525161/1	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
87	1525161/8	++	+
88	1528132/2	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
89	1528132/9	++	+
90	1409537/18	-	-
91	1409537/9	+	+
92	A453/15-5	-	+
93	A453/15-2	+++	-

94	959500/3	-	-
95	959520/4	-	-
96	958520/8	++	+
97	1125968/8	++	+
98	A623/16-2	+	+
99	A2847/15-2	-	-
100	A135/15-2	++++	+++
101	A2821/16-7	+	+
102	1478259/6	-	-
103	1283426/6	-	++
104	A3019/15-5	+	+
105	A5541/6-6	+	+
106	A3900/15-5	-	-
107	A4158/16-8	+++	++
108	A4632/15-6	-	+
109	A2717/16-6	-	+
110	935130/8	-	-
111	935130/7	-	-
112	24D	-	-
113	18D	+	+
114	19B	-	+
115	16D	+	++++
116	21A	NÃO TEM ENDOMÉTRIO	NÃO TEM ENDOMÉTRIO
117	12A	-	+++
118	24A	+	++++
119	34A	-	-
120	16A	+	++++
121	15A	-	++++
122	15B	-	+++
123	17E	-	-
124	17A	-	++++

Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Grupo Endometriose

MARCADORES MOLECULARES E RECEPTORES HORMONAIS EM MULHERES COM ENDOMETRIOSE

Prezada Senhora,

Gostaria de convidá-la a participar de um estudo científico que tem o objetivo de gerar novos conhecimentos sobre a endometriose e outras doenças ginecológicas.

1 INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Esta pesquisa quer estudar novos testes para identificar alterações hormonais no sangue de mulheres com endometriose para o diagnóstico da doença. Além disso, quer estudar material de biópsia (pequenos pedacinhos retirados da parte de dentro do útero, do peritônio - membrana que protege seus órgãos - e dos ovários) para identificar como a doença invade o organismo de umas mulheres mais do que de outras. Esse material de biópsia já seria retirado no momento da sua cirurgia, sem qualquer risco adicional para a senhora. A endometriose pode acometer pessoas sem sintomas e também pode ser confundida com outras doenças. Ainda não se sabe por que, em algumas mulheres, a doença é leve e em outras ela é tão grave. Sendo assim, estudaremos também pessoas saudáveis que pretendem fazer ligadura de trompas, assim como pessoas que serão operadas de cisto de ovário (de qualquer tipo) ou qualquer outra doença ginecológica benigna (miomas, investigação de infertilidade conjugal e dor pélvica crônica). Esse material será submetido a exames para identificar substâncias possivelmente relacionadas ao efeito da endometriose e cistos ovarianos sobre os ovários. A coleta de material será realizada no Biocor Instituto, onde será avaliado. Os resultados dos exames serão utilizados para o respectivo estudo, resguardado o sigilo do paciente. O material coletado será armazenado e, caso não utilizado em sua totalidade, será armazenado para estudos futuros. Caso isso aconteça, a senhora será contatada para autorizar seu uso.

2 SIGILO DOS DADOS

Todos os seus dados serão confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a essas informações, que serão utilizadas somente para fins de pesquisa. Os dados obtidos serão utilizados para elaboração de artigos científicos, sendo garantida a confidencialidade da identidade dos pacientes participantes da pesquisa, sendo que material residual (não utilizado neste estudo) será mantido em arquivo e poderá ser utilizado para futuros projetos de pesquisa após sua autorização. Caso deseje, é possível optar pela destruição desse material residual.

3 BENEFÍCIOS DA PESQUISA

Este estudo trará informações que poderão ajudar muitas mulheres no futuro. O conhecimento de algumas alterações hormonais associadas à endometriose poderá ajudar no desenvolvimento de novos métodos para diagnosticar e acompanhar a doença. O estudo das biópsias poderá ajudar a entender como a doença invade o organismo e o que está envolvido na sua gravidade, podendo, no futuro, auxiliar no desenvolvimento de novos medicamentos ou maneiras de se bloquear o avançar da doença.

4 RISCOS

A coleta de sangue será realizada em veia do braço ou da mão, em pequena quantidade (10 mL, volume equivalente a duas colheres de sopa). A coleta de sangue pode causar leve desconforto no local da coleta e, de vez em quando, uma pequena mancha (hematoma), que desaparece sozinha. O sangue será colhido em material estéril e descartável, que não oferece risco à sua saúde. A biópsia será realizada no momento da cirurgia, sob anestesia, não causando dor ou qualquer risco adicional à senhora. Lembra-se mais uma vez de que essas biópsias já seriam realizadas durante a cirurgia. A coleta de material de dentro do útero (biópsia de endométrio) também será feita sob anestesia, antes da cirurgia, e não causa dor ou desconforto adicional. A coleta desse material é passo fundamental para entender os mecanismos que levam à endometriose.

5 RESSARCIMENTO DAS DESPESAS

Não está prevista qualquer forma de remuneração para as voluntárias, nem ressarcimento de despesas (não haverá ajuda de custo para as voluntárias *nem mesmo para deslocamento até o hospital*. Entretanto, as despesas específicas relacionadas ao estudo são de responsabilidade dos pesquisadores).

6 DEMAIS ESCLARECIMENTOS

Você tem total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa. Você poderá recusar-se a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar se explicar. A aceitação ou não da participação neste estudo não influenciará no seu tratamento.

7 TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, voluntariamente, concordo em participar desta pesquisa no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Estou ciente do exposto acima e, ainda, de que esta pesquisa não trará qualquer prejuízo à minha saúde.

Belo Horizonte,.....de.....de.....

Assinatura da voluntária

Assinatura da pesquisadora

Pesquisadoras: - Doutoranda Ivete de Ávila e Prof^a. Márcia Mendonça Carneiro
 Av. Prof. Alfredo Balena, 190 - Belo Horizonte - MG - Brasil - CEP 30130-100
 Telefones: (31) 99573341/34099764. *E-mail:* marciamc@medicina.ufmg.br
 COEP-UFMG: Av. Antonio Carlos, 6.627- Unidade Administrativa II – 2º andar sala
 2005 CEP: 31270-901. Telefax: (31) 3409-4592. *Email:* coep@prpq.ufmg.br

Apêndice C - Passo a passo da técnica da imuno-histoquímica

Etapa	Procedimentos
Desparafinização e reidratação	<p>Deixadas as lâminas <i>overnight</i> na estufa a 56°C.</p> <p>Lavadas as lâminas 3 vezes no xilol, durante 5 minutos cada, com leve agitação.</p> <p>Lavadas as lâminas 3 vezes no álcool etílico 100% e 80%, durante 5 minutos cada, com leve agitação.</p> <p>Lavadas as lâminas 3 vezes na água corrente, durante 5 minutos cada, com leve agitação.</p>
Recuperação antigênica induzida pelo calor	<p>Aquecidas as lâminas em solução de citrato de sódio 0,01M (pH 6,0) a 90° C por 20 minutos.</p> <p>Resfriadas as lâminas por 20 minutos.</p> <p>Lavadas as lâminas 3 vezes na água deionizada, durante 5 minutos cada, com leve agitação.</p>
Bloqueio da peroxidase endógena	<p>Adicionados 400 µL da solução de bloqueio da peroxidase do NOVOLINK (FRASCO AMARELO) na lâmina.</p> <p>Lavadas as lâminas 2 vezes no Tris - TBS, durante 5 minutos cada, com leve agitação.</p>
Bloqueio de proteínas	<p>Adicionados 400 µL da solução de bloqueio de proteínas do NOVOLINK (FRASCO VERDE) nas lâminas e aguardado 10 minutos.</p> <p>Lavadas as lâminas 2 vezes no Tris - TBS, durante 5 minutos cada, com leve agitação.</p>
Reação do anticorpo primário	<p>Diluído o anticorpo primário em diluente específico:</p> <p>Aplicado o anticorpo primário diluído.</p> <p>Anticlaudin 3, ac. poli de coelho, marca ABCAM, AB15102 da Biogen.</p> <p>Anticlaudin 4 antibody EPRR17575, ABCAM, AB210796, da Biogen.</p> <p>Incubadas as lâminas por 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente.</p> <p>Lavadas as lâminas 3 vezes no Tris - TBS, durante 5 minutos cada, com leve agitação.</p>
Bloqueio pós-primário	<p>Adicionados 400 µL da solução de bloqueio pós-primário do NOVOLINK (FRASCO VERMELHO) na lâmina e aguardados 50 minutos.</p> <p>Lavado as lâminas 2 vezes no Tris - TBS, durante 5 minutos cada, com leve agitação.</p>
Reação do polímero (anticorpo secundário)	<p>Aplicado 400 µL da solução do polímero NOVOLINK.</p> <p>Incubados por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente.</p> <p>Lavadas as lâminas 3 vezes no PBS, durante 5 minutos cada, com leve agitação.</p>
Preparo e reação do sistema de detecção	<p>Diluídos 50 µL do cromógeno DAB em 1 mL de solução tampão substrato do DAB.</p> <p>Aplicados 200 µL da solução cromógeno/substrato DAB.</p> <p>Incubados por aproximadamente 5 segundos em câmara úmida à temperatura ambiente.</p> <p>Lavadas as lâminas 3 vezes na água corrente, durante 5 minutos cada, com leve agitação.</p>

Contracoloração	Passadas as lâminas na hematoxilina por 30 segundos. Lavadas em água corrente por 1 minuto. Lavadas 3 vezes no álcool etílico por 1 minuto. Lavadas 2 vezes no xilol por 1 minuto. Montadas as lâminas.
-----------------	---

Apêndice D – Tabela de Comparação das expressões das CLDN-3 e CLDN-4 em duas amostras de imuno-histoquímica de tamanhos diferentes

	Amostra inicial ⁽¹⁾ n=78		Amostra estudada ⁽²⁾ n=48		Valor-p*
	N (%)	% (proporcional)	N (%)	% (proporcional)	
CLDN-3(+)	34 (43,6%)	34/62=54,8	28 (58,3%)	28/62=45,2	0,285
CLDN-4(+)	60 (76,9%)	60/101=59,4	41 (85,4%)	41/101=40,6	0,008

*Teste Z de proporção

- (1) Amostra inicial: número total de amostras de 78 submetidas a imuno-histoquímica
- (2) Amostra estudada: grupo de amostras de 48 entre as 78 que tiveram sítio anatômico de origem reconhecida e dados completos dos prontuários para incluir na pesquisa.

Nessa análise, a proporção das expressões de CLDN-3 foi a mesma nas duas amostras ($p > 0,5$). Foi visto maior proporção de expressão da CLDN-4 na amostra inicial ($p < 0,05$), porém esta expressão manteve o padrão de ser mais frequente do que a CLDN-3 nas duas amostras.