

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

LIV BRAGA DE PAULA

**APOPTOSE E EXPRESSÃO DE PROTEÍNA BCL-2 NOS
IMPLANTES DE ENDOMÉTRIO ECTÓPICO DE PACIENTES
PORTADORAS DE ENDOMETRIOSE**

Belo Horizonte

Minas Gerais - Brasil

2009

LIV BRAGA DE PAULA

**APOPTOSE E EXPRESSÃO DE PROTEÍNA BCL-2 NOS
IMPLANTES DE ENDOMÉTRIO ECTÓPICO DE PACIENTES
PORTADORAS DE ENDOMETRIOSE**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina.

Área de concentração: Saúde da Mulher
Orientador: Selmo Geber
Co- orientadores: Luciana Moro
Marcos Mendonça

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina da UFMG

2009

Ao Frederico, cujo amor
ilumina meu caminho sempre.

Aos meus pais, Lúcio e Simone,
exemplos de amor e superação.

Aos meus irmãos Ivie e Igor pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pelas oportunidades a mim concedidas.

Ao professor Marcos Mendonça pela confiança e apoio.

À professora Luciana Moro, pela amizade, exemplos, ensinamentos, incentivo e por acreditar sempre nesse sonho.

Ao professor Selmo Geber pelas contribuições na reta final...

À Núbia, muito mais que colaboradora, amiga na busca da luz no fim do TUNEL.

Aos meus amigos Múcio, Cláudia e Beatriz , pelo incentivo e apoio.

Aos colegas do Laboratório de Apoptose do Departamento de Patologia do ICB, pela paciência, disponibilidade e ensinamentos.

Aos colegas, residentes e funcionários do Serviço de Vídeo-endoscopia Ginecológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, pela ajuda na coleta dos casos.

À professora Lúcia Porto Fonseca de Castro, pelo acolhimento, disponibilidade e apoio na realização da imunoistoquímica.

Aos técnicos Ailton e Lourdinha do Departamento de Anatomia Patológica da FM/ UFMG.

Às pacientes, que gentilmente consentiram em participar da pesquisa.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>c-myc</i> –	gene <i>c-myc</i>
<i>P53</i> -	Proteína 53
<i>apo-1/fas</i> –	Receptor da família do fator de necrose tumoral
<i>Bcl-2</i> –	Linfoma /leucemia de células B 2
<i>Bcl-x “long”</i> -	Linfoma/leucemia célula B x longo
<i>Bcl- w</i> -	Linfoma/leucemia célula B w
<i>Bax</i> -	Bcl- 2 associado à proteína X
<i>Bcl-x “short”</i> -	Linfoma/leucemia célula B x curto
<i>Bak</i> -	Antagonista/”killer” homologos de Bcl-2
<i>Bad</i> -	Agonista de morte celular associado a Bcl- 2
<i>P450 aromatase</i> –	Enzima aromatase p 450
<i>sl CAM-1</i> –	Forma solúvel da molécula de adesão intercelular
<i>FasL</i> –	Ligante de Fas
<i>IL 6</i> –	Interleucina 6
<i>IL8</i> –	Interleucina 8
<i>TNF alfa</i> –	Fator de necrose tumoral alfa
<i>VEGF</i> –	Fator de crescimento de endotélio vascular
<i>DNA</i> -	Ácido desoxirribonucleico
<i>ELISA</i> -	Ensaio imunoadsorvente ligado a enzima
<i>COEP</i> –	Comitê de Ética em Pesquisa
<i>TUNEL</i> –	Marcação “in situ” da fragmentação do genoma com transferase terminal de deoxinucleotídeo

<i>PBS</i> –	Solução salina tamponado de fosfato
<i>TdT</i> -	Enzima transferase terminal de doxinucleotídeo
<i>DAB</i> –	Diaminobenzidina
<i>H2O2</i> –	Peróxido de hidrogênio
<i>BSA</i> –	Albumina de soro bovino
<i>Tris EDTA</i> -	Tris (hidroximetil) aminometano ácido etilienodiamino tetracético
<i>Caspase</i> -	protease de cistina específica de aspartato
<i>ml</i> -	Mililitro
<i>mg</i> -	Miligrama
<i>g</i> -	Gramma
<i>pH</i> -	Potencial hidrogeniônico
<i>°C</i> -	Graus Celsius
<i>µg</i> -	Micrograma
<i>µm</i> -	Micrômetro
<i>ESHRE</i> -	Sociedade européia de reprodução humana e Embriologia
<i>ASRM</i> -	Sociedade americana de medicina reprodutiva
<i>CA125</i>	<i>Antígeno carcinogênico 125</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição das pacientes de acordo com a idade e a presença de endometriose	27
Tabela 2	Distribuição de dor pélvica crônica, dismenorréia, infertilidade e presença de endometriose	28
Tabela 3	Distribuição do índice apoptótico e estadiamento da endometriose.....	31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Avaliação da evolução do Desvio padrão das médias de células apoptóticas por número de campos contados	19
Gráfico 2	Índice apoptótico das pacientes portadoras de endometriose e não portadoras	29
Gráfico 3	Comparação do índice apoptótico entre pacientes com endometriose e as sem a doença	30
Gráfico 4	Comparação entre o índice apoptótico e a fase do ciclo menstrual entre o grupo das pacientes portadoras de endometriose e as pacientes sem a doença	30
Gráfico 5	Comparação da expressão da proteína bcl-2 entre as pacientes portadoras de endometriose e nas sem a doença	33
Gráfico 6	Comparação da expressão da proteína bcl-2 de acordo com a fase do ciclo menstrual entre pacientes portadoras de endometriose e nas pacientes sem a doença	33

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Hipótese da evolução das lesões	07
Figura 02	Seqüência de eventos na apoptose	10
Figura 03	Identificação da apoptose nos cortes corados em Hematoxilina- Eosina	22
Figura02	Apoptose pela técnica do TUNEL	24
Figura 03	Expressão do oncogene Bcl-2 nas células endometriais	26
Quadro 01	Distribuição das pacientes de acordo com a fase do ciclo menstrual	28
Quadro 02	Distribuição do índice apoptótico e estadiamento da endometriose	32

RESUMO

OBJETIVO: No presente estudo foram avaliadas a apoptose e a expressão do oncone Bcl-2 nos implantes de endométrio ectópico de pacientes portadoras de endometriose e no endométrio eutópico de pacientes não portadoras dessa doença.

PACIENTES E MÉTODOS: Entre março de 2007 e janeiro de 2008, foram selecionadas 16 pacientes para inclusão no estudo as quais foram divididas em dois grupos: (a) grupo a – constando de 8 com endometriose pélvica (b) grupo b controle - 8 pacientes sem endometriose. A coleta do material para análise foi feita durante cirurgias realizadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Fragmentos de útero eutópico e de implantes ectópicos foram fixados em formol tamponado a 10% e processados para inclusão em parafina. Cortes de 4µm foram corados em Hematoxilina-eosina e submetidos à morfometria para cálculo do índice apoptótico. Alguns fragmentos foram submetidos à reação de TUNEL para a marcação “in situ” da apoptose e à imunohistoquímica para avaliar a expressão da proteína Bcl-2.

RESULTADOS: Observou-se que o índice apoptótico foi significativamente menor no endométrio ectópico das pacientes com endometriose, quando comparado ao endométrio eutópico das mulheres saudáveis independente da fase do ciclo menstrual. A expressão de bcl-2 foi maior no endométrio ectópico das pacientes com endometriose.

CONCLUSÃO: Os presentes resultados sugerem que os implantes ectópicos apresentam deficiência do processo de morte celular via apoptose. Conseqüentemente, essas células apresentam maior sobrevivência e maior chance de colonizar e se desenvolver em sítios ectópicos. Esse fator parece ser fundamental na patogenia da endometriose.

Palavras-chave: apoptose, endometriose, Bcl-2

ABSTRACT

This study evaluated and compared spontaneous apoptosis and Bcl-2 expression in eutopic endometrium from women without endometriosis and ectopic endometrium of women with the disease. Between March 2007 and December 2008, 16 women who underwent to a gynecology surgery in HC UFMG participated in this study: 8 with endometriosis and 8 controls. The specimens collected were analysed for apoptosis and expression of Bcl-2. Apoptotic cells were detected with the use of dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay. Bcl-2 expression was assessed with the use of the immunohistochemical technique. Spontaneous apoptosis was significantly lower in ectopic endometrium from patients with endometriosis, compared with eutopic endometrium of controls and was independent of the cycle phase. The expression of Bcl-2 was increased in ectopic endometrium of women with endometriosis, mainly in secretory phase. In conclusion, the present study indicates that ectopic endometrium from patients with endometriosis is less susceptible to apoptosis than endometrium from controls due to a higher expression of Bcl-2. So, these cells present increased survival ability that results in continuous growth into ectopic locations. This factor would be fundamental to the pathogenesis of the disease.

Key words: apoptosis, endometriosis, Bcl-2

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	vi
Lista de tabelas	vii
Lista de gráficos.....	ix
Lista de ilustrações	x
Resumo	xi
Abstract	xii
1.Introdução.....	01
2 .Literatura consultada	04
2.1 Diagnóstico da endometriose	05
2.2 Patogenia e papel da apoptose	08
3 .Objetivo	17
4 .Pacientes e métodos	
4.1 Pacientes	18
4.2 Métodos	20
Determinação do índice apoptótico	20
Identificação in situ da fragmentação do DNA segundo a técnica de TUNEL	22
Estudo imunohistoquímico da expressão do bcl-2	24
Análise estatística	26
5 .Resultados	
5.1 Caracterização das pacientes	27
5.2 Comparação da apoptose nos implantes de endométrio ectópico das pacientes portadoras de endometriose e no endométrio eutópico das pacientes não portadoras	29
5.3 Avaliação da expressão do oncogene Bcl-2 nos implantes de endométrio ectópico das pacientes portadoras de endometriose e no endométrio eutópico das pacientes não portadoras	32
6 .Discussão	34
7 .Conclusão	40
8 .Referências bibliográficas	41
9 . Anexos	47
Anexo 1 - Termo de consentimento e aprovação do COEP	
Anexo 2 – Classificação da endometriose ASMR	
