

1 - INTRODUÇÃO

Endometriose é o termo que define a presença de tecido glandular e/ou estroma endometrial funcionante fora do útero (1,2,3). É uma afecção benigna, progressiva e dependente de estrógeno que acomete 2 a 18% das mulheres da população geral e 5 a 50% das mulheres com dor pélvica crônica e/ou infertilidade (4).

A endometriose tem como manifestações clínicas mais freqüentes: dor pélvica, dismenorréia, dispareunia e infertilidade. Podem estar presentes sintomas associados aos sítios acometidos, como por exemplo, a presença de hematoquesia, tenesmo e diarréia em casos de acometimento intestinal (5).

Os locais afetados com maior freqüência são os órgãos pélvicos e o peritônio, podendo ser encontrada em sítios mais distantes. A extensão da doença varia de lesões pequenas presentes nos órgãos pélvicos ou peritônio a grandes cistos endometrióticos no ovário (endometriomas) e/ou presença de fibrose e aderências extensas causando distorção da anatomia pélvica (5). As lesões endometrióticas podem se apresentar como um achado cirúrgico casual em mulheres assintomáticas ou associadas ao conjunto de sinais e sintomas descritos anteriormente.

Apesar da alta prevalência da endometriose e da sua primeira descrição ter sido feita há três quartos de século (Sampson,1927), o conhecimento sobre a etiologia e fisiopatologia da mesma é incerto (1) .

Com relação à etiopatogenia, três teorias principais têm sido propostas para o desenvolvimento do tecido endometrial: (1) metaplasia celômica; (2) remanescentes mullerianos e (3) implante de células endometriais advindas

de fluxo menstrual retrógrado (2,3,6,7).

A teoria da metaplasia celômica foi introduzida por Meyer no início do século vinte. Baseia-se no princípio de que estímulos como infecção e alterações hormonais podem desencadear metaplasia nos órgãos derivados do epitélio celômico o que poderia resultar em endometriose (8).

A teoria dos remanescentes mullerianos sugere que sob estímulos específicos os mesmos poderiam se diferenciar em tecido endometrial. Esta teoria se justifica nos casos raros de endometriose em homens ou em sítios distantes (8).

A teoria da menstruação retrógrada é também descrita como teoria da implantação ou de Sampson. Esta propõe que o tecido endometrial viável reflui através das trompas uterinas durante a menstruação e se implanta no peritônio ou órgãos pélvicos (8).

A teoria da menstruação retrógrada, apesar de bem embasada por diversos estudos, não responde a algumas questões essenciais, quais sejam: (1) por que somente 10 a 15% das mulheres da população apresentam a endometriose se 100% delas têm fluxo retrógrado durante a menstruação? (2) Por que existe diferença entre os graus de apresentação da doença?(2).

Após a disseminação das células na cavidade peritoneal, para que a endometriose progrida, devem ocorrer os seguintes estágios: adesão, proteólise, proliferação, angiogênese e cicatrização. Para tanto, Vinatier (2001) sugeriu que além da presença das células endometriais ectópicas, outros fatores devem estar associados ao desenvolvimento da endometriose. Possíveis alterações nos implantes de endométrio ectópico seriam responsáveis pelo aumento da resistência à defesa peritoneal local. Além disso, a existência de anormalidades na imunidade celular e humoral nas

pacientes com endometriose poderia estar associada ao aumento na receptividade do mesotélio peritoneal, hiperatividade dos macrófagos e alteração na função das células “natural killer” (1, 2,9,10).

Em pacientes portadoras de endometriose encontram-se alterações no endométrio, também observadas nos implantes ectópicos. Uma vez que estas modificações não são encontradas no endométrio de pacientes sem a doença, é sugerido que o defeito primário da endometriose possa estar presente no endométrio eutópico (10,11,12,13). Uma das alterações evidenciadas tanto nos implantes ectópicos quanto no endométrio eutópico de pacientes com endometriose é a alteração na regulação da apoptose (5,14).

A apoptose é um processo fundamental para a homeostase tecidual (15). É determinada por eventos bioquímicos e morfológicos que resultam em eficiente eliminação de células sem a indução de processo inflamatório (1).

O desequilíbrio do processo de morte celular via apoptose pode estar relacionado com várias entidades nosológicas. Quando em excesso resulta em imunossupressão (ex: AIDS, Doença de Alzheimer e Parkinson). Por outro lado, a deficiência da apoptose é responsável por alterações como as neoplasias.

A apoptose é controlada pela expressão de alguns genes reguladores como o c-myc, p53 e apo-1/fas. Entretanto, um dos avanços mais importantes na compreensão da apoptose advém da família de oncogenes bcl-2 (4). As proteínas Bcl-2, Bcl-x longo e Bcl-w inibem a apoptose; enquanto Bax, Bcl-x curto, Bak e Bad estimulam a apoptose (16). Oltvai e Korsmeyer (1993) demonstraram que a relação entre a expressão do bcl-2 e do bax é fator determinante para a susceptibilidade celular à apoptose (2).

Há indícios de que a deficiência da apoptose esteja envolvida com a maior

sobrevivência das células endometriais presentes na cavidade abdominal após refluxo menstrual. Um possível responsável pelo aumento da sobrevivência dessas células seria o aumento da expressão de algum membro anti-apoptótico da família de proteínas Bcl-2 (1,4,13,15,16,17,18,19).

A endometriose é uma doença de significativa prevalência e que altera consideravelmente a qualidade de vida das mulheres acometidas. Porém, sua patogênese permanece obscura. O presente estudo tem como propósito avaliar a importância da inibição da morte celular via apoptose na patogenia da endometriose.

2 – LITERATURA CONSULTADA

2.1 DIAGNÓSTICO DA ENDOMETRIOSE

Estabelecer o diagnóstico de endometriose com base apenas na presença dos sintomas é difícil, pois a apresentação clínica da doença é variável e os sintomas podem estar presentes também em outras condições clínicas como, por exemplo, a doença inflamatória pélvica, síndrome do intestino irritável e cistite intersticial (5).

Os achados do exame físico das pacientes de endometriose variam segundo o estadiamento e a localização predominante. Em pacientes com endometriose mínima ou leve pode não ocorrer nenhuma alteração. Entretanto, em estágios mais avançados podem ser identificados sinais sugestivos de endometriose como: dor pélvica à palpação abdominal, retroversão fixa do útero, dor à palpação dos ligamentos uterosacros, presença de nódulos palpáveis no fundo de saco de Douglas e o achado de lesões no colo uterino ou parede vaginal (5).

A dosagem do CA125 plasmática pode estar elevada nas pacientes portadoras de endometriose, mas é inespecífica e seu uso não é sugerido como ferramenta diagnóstica. A ultrassonografia tem importância na identificação de endometriomas ovarianos e na pesquisa de envolvimento vesical e retal. A ressonância magnética apresenta resultados superiores aos da ultrassonografia, não sendo indicada na rotina (5).

A inspeção da pelve através da laparoscopia é considerada, atualmente, o padrão ouro na investigação da endometriose, pela Sociedade Européia de Reprodução Humana e Embriologia - *ESHRE* (5).

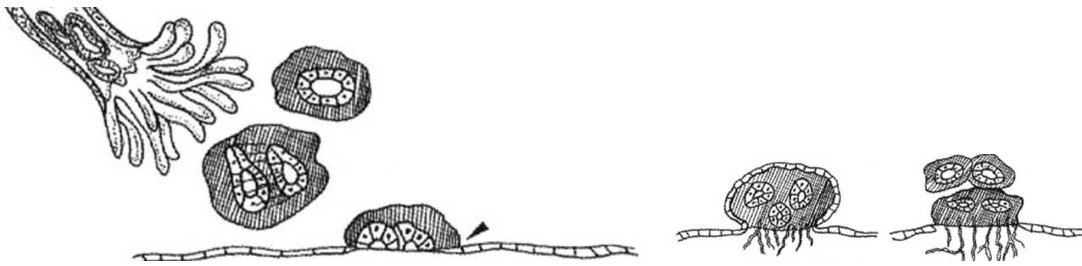
No procedimento cirúrgico consideram-se como típicas as lesões negras ou azuladas, resultantes de sangramento e retenção de pigmentos e restos celulares intraluminais. São classificadas como lesões atípicas: aquelas de coloração avermelhada em forma de chama de vela ou vesicular; as lesões brancas e os defeitos peritoneais. Esses tipos de lesão representam diferentes estágios de desenvolvimento e atividade do implante (20).

As lesões vermelhas são excrescências glandulares e, provavelmente, constituem o primeiro estágio de implantação do tecido endometrial, com vascularização e proliferação celular intensa sendo consideradas lesões jovens e ativas (Figura 1) (20).

O sangramento e crescimento deste tecido desencadeiam processo inflamatório ao redor da lesão, formando cicatriz de coloração escura sendo então denominada como lesão negra (20).

A seguir, a fibrose e redução da vascularização deixam a lesão opaca, com aspecto cicatricial a qual é denominada lesão branca. Tal lesão é considerada estágio latente da endometriose, provavelmente em fase inativa (20).

No exame histopatológico podem ser identificadas a presença de tecido epitelial glandular, estroma endometrial, fibrose com hemorragia e, eventualmente, tecido muscular liso em material obtido de coleta de amostra durante a cirurgia ginecológica. O resultado negativo não exclui a presença da doença (5).



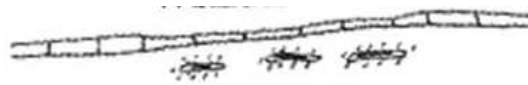
Adesão das células endometriais, proliferação celular,
angiogênese.

Lesões vermelhas



Inflamação e cicatrização.

Lesões coloração negra



Fibrose

Lesões brancas

Figura 01 - Hipótese da evolução das lesões adaptado de Donnez (2003).

2.2 PATOGENIA E O PAPEL DA APOPTOSE

A presença de células endometriais na cavidade abdominal é condição necessária, mas insuficiente para explicar o desenvolvimento da endometriose. Considera-se que mudanças na concentração hormonal e alterações na imunidade local possam contribuir para o desenvolvimento e manutenção da doença (3,8,13) .

A estimulação estrogênica tem papel fundamental na patogênese da endometriose. Os níveis séricos de estrogênio das mulheres portadoras de endometriose não diferem daqueles apresentados por pacientes sem a doença, entretanto há aumento na concentração local deste hormônio nas portadoras da doença (3). Sugere-se que este aumento se deva a uma expressão patológica da aromatase P450 – responsável pela conversão da androstenediona em estradiol. Há também uma expressão deficiente da 17beta hidroxisteróide 2, enzima cuja função se associa a inativação do estradiol. Associado ao aumento da concentração local de estradiol, tem-se um aumento na concentração da ciclooxygenase-2. Esta é responsável pelo aumento da resposta inflamatória, e conseqüentemente pelos sintomas de dor e dismenorréia (2,3,8,21,22).

O papel das anormalidades imunológicas no desenvolvimento e persistência da endometriose é complexo. Não é claro se há apenas uma predisposição imunológica ou se há combinação entre esta e a indução de resposta imune deficiente pela presença do implante. Demonstrou-se que ocorre diminuição da ação das células *natural killer* contra as células endometriais provavelmente pelo aumento da expressão da forma solúvel da molécula de adesão intercelular (sICAM-1). Outra alteração descrita envolve a hiperexpressão do FasL no tecido endometriótico, que determina a indução da apoptose nas células imunes FasL positivas (2,21).

O conteúdo celular do fluido peritoneal advém da superfície dos órgãos pélvicos e populações de células imunes. Em mulheres com endometriose, há no fluido peritoneal e nas lesões endometrióticas, maior concentração de macrófagos ativados, fatores de crescimento e citocinas como as IL6, IL8 e TNF alfa. A IL6 induz a secreção de várias outras citocinas e promove a ativação das células imunes. A IL8 determina a adesão endometrial na matriz extracelular e promove o crescimento do implante. Já o TNF alfa é a citocina com maior importância na endometriose – seus níveis estão diretamente relacionados à gravidade da doença. Sugere-se também, que nos implantes endometrióticos, encontre-se aumentada a concentração de VEGF, responsável pela formação dos novos vasos sanguíneos para suprimento da lesão (8,23).

Além das alterações acima descritas, evidencia-se alteração na regulação da apoptose nos implantes de endométrio ectópico e no endométrio eutópico de pacientes com endometriose (8,14).

A apoptose é um tipo de morte celular ativa cujo funcionamento necessita de energia, síntese e degradação protéica (24). A apoptose participa do desenvolvimento embrionário e na organogênese, na renovação de células epiteliais, na involução cíclica dos órgãos reprodutivos na senilidade, na hipotrofia induzida pela remoção de fatores de crescimento ou de hormônios, na involução de alguns órgãos e ainda na regressão de tumores (25).

A apoptose é um processo rápido, que se completa em torno de 3 horas e assíncrono. Assim vários estágios de apoptose podem ser observados no mesmo tecido num determinado momento. É considerado um tipo de morte celular desejável programada e seletiva, que envolve células isoladas sendo regulada intrínseca e extrinsecamente (25)

O processo de apoptose pode ser dividido em quatro fases distintas. A primeira fase envolve a ativação de moléculas regulatórias que têm participação no estímulo inicial. Esse estímulo transmite sinais de estresse celular para as mitocôndrias que, dependendo da intensidade, podem sinalizar a ativação da apoptose (Figura 2).

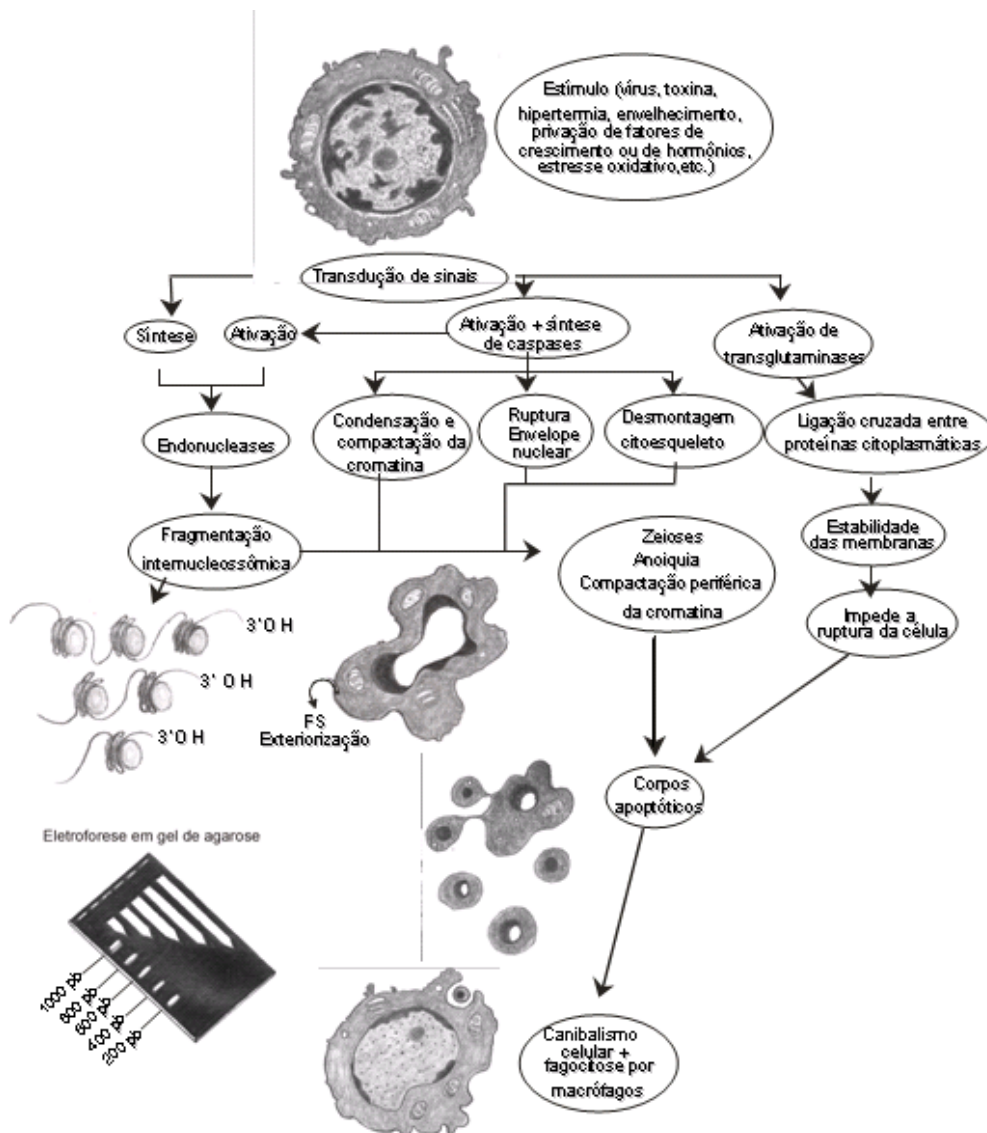


FIGURA 02 Seqüência de eventos na apoptose. (esquema cedido por Moro, 2009).

A fase efetora ou de execução da apoptose ocorre a seguir, com a

ativação de cascatas enzimáticas que culminam com a fragmentação do genoma, do núcleo e da célula, formando os corpos apoptóticos. Finalmente, há o reconhecimento e eliminação dos corpos apoptóticos resultantes (1).

Com relação à indução, uma variedade de estímulos, como a privação de fatores de crescimento, uso de glicocorticóides, danos no DNA, exposição a radiação ionizante, tratamentos utilizando drogas quimioterápicas e/ou estresse podem induzir apoptose (1).

Na via extrínseca ocorre sinalização entre o meio extra e intracelular através de receptores da superfície celular, através do Fas que recebe a ligação de moléculas ligantes (Fas L) produzidos por células do sistema imune e pela ativação da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNF R1, TNF R2) e dos receptores do ligante indutor da apoptose relacionado ao TNF (TRAIL R1, TRAIL R2). Após esta sinalização há ativação de enzimas intracelulares, como as caspases iniciadoras (caspase 8 e 10), que encontravam-se inativas. Estas enzimas ativam as caspases executoras (caspase 3, 6 e 7) que destroem estruturas celulares culminando com a morte celular. Todos os eventos bioquímicos ocorrem de forma dinâmica e simultânea (26).

Na via intrínseca da apoptose, uma organela de grande importância, é a mitocôndria, que após recebidos os sinais de morte, aumenta a permeabilidade ao citocromo c por mecanismos ainda desconhecidos. Este fator localiza-se no espaço entre a membrana interna e externa da mitocôndria, é liberado para o citoplasma e liga-se ao Apaf-1 que ativa a caspase 9. Outro mecanismo via mitocôndria se dá através da ativação do fator indutor de apoptose (AIF). Este fator localiza-se no espaço entre a membrana interna e externa da mitocôndria, sendo liberado dessa organela após estímulo de morte celular. Ele age independente das caspases, pois se desloca a partir da mitocôndria, passa pelo citoplasma e alcança o núcleo,

onde interage com o DNA, causando a condensação e a fragmentação deste a partir da ativação das endonucleases. Dessa forma, a permeabilização da membrana mitocondrial determina uma cascata de eventos subseqüentes que resultam em morte celular. Este evento é controlado principalmente por proteínas membro da família Bcl-2 (26).

Grande parte do avanço no entendimento dos eventos intracelulares reguladores da susceptibilidade celular da apoptose foi proporcionado pela identificação de alguns genes e suas proteínas como os da família bcl-2: B-cell lymphoma/leucemia 2 gene (24).

O bcl-2 localiza-se no cromossomo 18 é um proto-oncogene inibidor da apoptose, é a molécula melhor caracterizada do mecanismo de apoptose e é considerada um repressor da morte celular. Este gene codifica uma proteína mitocondrial, localizada no envelope nuclear, retículo endoplasmático e membrana mitocondrial externa, de vários tecidos normais e neoplásicos, com exceção de tecido muscular e hepático (1,18). Atualmente já foram descritos pelo menos 10 genes pertencentes à família bcl-2. Com base na sua função podemos dividi-los em dois grupos: os inibidores da apoptose bcl-2, bcl-x "long", bcl-w e mcl -1 e os indutores da apoptose como o bax, bcl-x "short", bak e bad (26). Os membros da família Bcl-2 são capazes de interagir através de associação homodimérica e heterodimérica; ou seja, a susceptibilidade de uma célula a um estímulo apoptótico é determinada pela proporção de membros pró-apoptóticos e anti-apoptóticos presentes nas células naquele momento. (16)

McLaren *et al* (1997) ao investigar a relação entre Bcl-X /Bax no endométrio observaram que essas proteínas são encontrados predominantemente nas células epiteliais glandulares e que a expressão do Bcl-2 é mais intensa na fase proliferativa do ciclo menstrual (27).

A expressão do Bcl-2 predomina no citoplasma das células glandulares da camada basal do endométrio e atinge seu pico no fim da fase folicular, praticamente desaparecendo na fase secretora. O estroma e suas artérias também apresentam variações cíclicas na expressão do bcl-2, ao contrário do endométrio ectópico (28,29).

Hopwood *et al* (1976) realizaram o primeiro estudo sobre a apoptose no endométrio humano e identificaram alterações morfológicas características da apoptose no endométrio variando de acordo com a fase do ciclo menstrual. Concluíram que há uma considerável perda de tecido epitelial glandular com formação de corpos apoptóticos nas fases secretora tardia, pré-menstrual e menstrual, entretanto esta ocorreu também, em menor extensão, na fase proliferativa (30).

À microscopia óptica, as células apoptóticas são retraídas (tipicamente circundadas por um halo claro), possuem citoplasma acidófilo. Os núcleos sofrem retração e a cromatina se condensa em massas densas, inclusive adjacentes à membrana nuclear, conferindo um aspecto de crescente. As organelas tornam-se compactas, permanecendo estruturalmente intactas e formam-se digitações (zeioses) na superfície da membrana plasmática. No decorrer do processo, há fragmentação nuclear e a formação de corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são fagocitados pelas células adjacentes num processo denominado canibalismo celular. Este fenômeno ocorre na ausência de inflamação (18,25,29).

Várias alterações bioquímicas podem ser observadas quando a célula entra em apoptose e muitas delas têm sido utilizadas para detectar esse tipo de morte celular. Entre essas, ressalta-se a clivagem do DNA genômico em fragmentos múltiplos de 180 – 200 pares de bases, que é um quadro típico de processo de apoptose em vários sistemas celulares. Na apoptose, como consequência da atividade de endonucleases, o DNA sofre fragmentação

internucleosômica, sem nenhuma especificidade de seqüência, porém mais intensamente na cromatina em configuração aberta. Essa fragmentação característica do genoma é facilmente vista laboratorialmente pela eletroforese de DNA em gel de agarose, produzindo o clássico padrão em escada (25).

Todavia, esse método não provê informação sobre a localização histológica das células em apoptose. Esse problema pode ser solucionado marcando *in situ* as extremidade 3'-OH do DNA fragmentado. Para tanto, utiliza-se a enzima transferase terminal de doxinucleotídeo – Tdt, que incorpora nucleotídeos marcados às extremidades livres do genoma com transferase terminal de doxinucleotídeo (25).

Meresman *et al* (2000) avaliaram e compararam a apoptose e expressão do Bcl-2 e Bax no endométrio eutópico de 14 pacientes com endometriose e 16 pacientes sem a doença. Observou-se que a apoptose no endométrio eutópico foi menos freqüente nas pacientes com endometriose quando comparada ao grupo controle – independente da fase do ciclo menstrual. Houve aumento na expressão da proteína Bcl-2 na fase proliferativa do ciclo menstrual de mulheres com endometriose. A expressão do Bax só ocorreu na fase secretora. Concluíram que as mulheres com endometriose apresentam menor número de células apoptóticas no tecido tópico e que a sobrevivência anormal destas células pode resultar em seu crescimento em localizações ectópicas (15).

Analisando a apoptose no endométrio eutópico de 52 pacientes portadoras de endometriose e 73 pacientes sem a doença, durante a fase secretora do ciclo menstrual, Szymanowski (2007) concluiu que o índice apoptótico nas glândulas e estroma das pacientes sem a doença foi superior àquele observado nas portadoras da endometriose. Foi realizada dosagem de progesterona em ambos os grupos e não houve correlação entre os níveis

do hormônio e a apoptose (19).

Ao se comparar o tecido endometrial eutópico de pacientes sem endometriose com os implantes ectópicos de pacientes com endometriose, observa-se que há menor incidência de apoptose nas pacientes com a doença (31).

Gebel and cols (1998) realizaram um estudo que incluiu 20 mulheres, sendo 10 delas portadoras de endometriose e 10 do grupo controle, nas quais foi avaliada a apoptose espontânea no endométrio eutópico e nos implantes de pacientes portadoras e no endométrio eutópico das pacientes do grupo controle. Foram incluídas pacientes submetidas à videolaparoscopia que apresentavam implantes endometriais exofíticos, das quais os fragmentos de endométrio foram obtidos através do uso da cureta de Novak. A análise da apoptose foi realizada com o kit de detecção de morte celular baseado em ELISA. Como resultado, observou-se que a apoptose foi menos freqüente nas pacientes portadoras de endometriose que nas pacientes sem a doença. Essa relação se manteve mesmo após a estratificação da fase do ciclo menstrual. Assim sendo, com base nos resultados os autores afirmam que há uma diminuição da susceptibilidade do endométrio a apoptose que pode contribuir para a etiologia ou patogênese da endometriose (31).

Dmowski (2001) analisou o endométrio tópico e implantes ectópicos de 11 pacientes portadoras de endometriose e comparou com o endométrio tópico de 6 pacientes sem a doença. Demonstrou que a apoptose dos implantes ectópicos foi significativamente menor que a encontrada no endométrio tópico do grupo controle. Não houve diferença significativa da apoptose entre os estágios da doença (12).

Béliard (2004) ao comparar a apoptose entre os implantes ectópicos e endométrio eutópico de pacientes não portadoras observou que os implantes

ectópicos apresentaram maior expressão do Bcl-2 e menor índice apoptótico. Não foi identificada diferença do índice apoptótico e expressão do bcl-2 entre as fases do ciclo menstrual (32).

Jones *et al* (1998) selecionaram 30 pacientes com diagnóstico de endometriose e 30 pacientes sem a doença e avaliaram a expressão do bcl-2 e a apoptose no endométrio tópico destas pacientes e compararam com os implantes de endométrio ectópico. As células apoptóticas foram detectadas utilizando a técnica do TUNEL e a expressão do bcl-2 foi demonstrada com utilização de imunistoquímica. Foi evidenciado que as células apoptóticas eram raras no tecido endometrial do grupo controle e não foi identificada diferença entre esse grupo e os implantes de endométrio ectópico do grupo de pacientes com endometriose. A expressão do bcl-2 encontrava-se aumentada na fase secretora tardia do endométrio de pacientes com endometriose $p < 0.05$ (18).

McLaren *et al* (1997), analisaram o endométrio tópico e implantes ectópicos de 10 pacientes portadoras de endometriose e o endométrio de 10 pacientes sem a doença para investigação da expressão do bcl-2 e bax. A obtenção da amostra do endométrio foi realizada através da dilatação do colo uterino com Vela de Hegar número 8 e posterior curetagem. Foi observada maior expressão do bcl-2 nas pacientes com endometriose. A expressão do bax foi evidenciada em ambas as fases, sugerindo que a sua expressão não seja controlada por estímulo hormonal (4).

Braun *et al* (2007), ao analisar quantitativamente a expressão dos genes bcl-2 e bcl-x longo e bcl-x curto, p53 em 10 pacientes portadoras de endometriose e 6 sem a doença, identificou nas mulheres com a doença um aumento da expressão do gene antiapoptótico bcl-x longo. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do bcl-2 (33).

3 - OBJETIVO:

Determinar o índice apoptótico e a expressão da proteína bcl-2 em implantes de endométrio ectópico de pacientes portadoras de endometriose e comparar com os índices encontrados nas amostras de endométrio tópico das pacientes sem endometriose.

4 – PACIENTES E MÉTODOS

No período de Março de 2007 a Janeiro de 2008, foram selecionadas para o estudo 19 mulheres, que após assinatura de consentimento informado (Anexo 1) foram divididas em dois grupos: (a) grupo de casos – onze pacientes com endometriose e (b) grupo controle – oito pacientes sem a doença.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica do Hospital das Clínicas da UFMG e Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG- COEP com parecer número 0434 -2006 (Anexo 1).

O grupo de casos constituiu-se, inicialmente, de 11 pacientes portadoras de endometriose submetidas à vídeolaparoscopia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG. Durante o procedimento cirúrgico foi realizada a determinação do estadiamento da endometriose de acordo com a classificação revisada da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva - Anexo 2 (34,35).

Considerou-se suspeita de endometriose a presença de lesões em estágio inicial com as características a seguir: focos brilhantes, de aspecto gelatinoso, rosados ou avermelhados, suavemente aderidos à serosa peritoneal, bem como os focos arredondados, salientes, de cor parda ou vermelho brilhante, localizados sobre tecido fibroso denso cicatricial.

Os casos só foram definitivamente incluídos nesse grupo após a confirmação histológica da endometriose nas lesões suspeitas e da confirmação da existência do número mínimo de campos microscópicos necessários para avaliação estatística. Com base nestes critérios foram excluídos 3 casos, sendo a análise realizada em 8 pacientes do grupo a

(portadoras de endometriose).

O grupo controle foi composto de 8 pacientes submetidas a cirurgias ginecológicas na mesma instituição, cujos procedimentos cirúrgicos permitiam a realização de coleta da amostra de endométrio e não apresentavam suspeita de endometriose.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas da análise:

- Pacientes com ciclos menstruais irregulares (<25 ou >35 dias)
- Pacientes após a menopausa
- Pacientes em uso de anticoncepcionais ou terapia de reposição hormonal
- Pacientes cujo exame histológico não confirmou a endometriose
- Pacientes que apresentaram a endometriose, confirmada à histologia, mas que suas lâminas não preenchiam o número mínimo de campos necessários previamente definido para análise estatística.

PROCESSAMENTO DAS LÂMINAS PARA A MICROSCOPIA ÓPTICA E

IMUNOISTOQUÍMICA

Para a microscopia óptica, as amostras coletadas foram fixadas em formol com tampão fosfato a 10% e processadas segundo a técnica de rotina para inclusão em parafina.

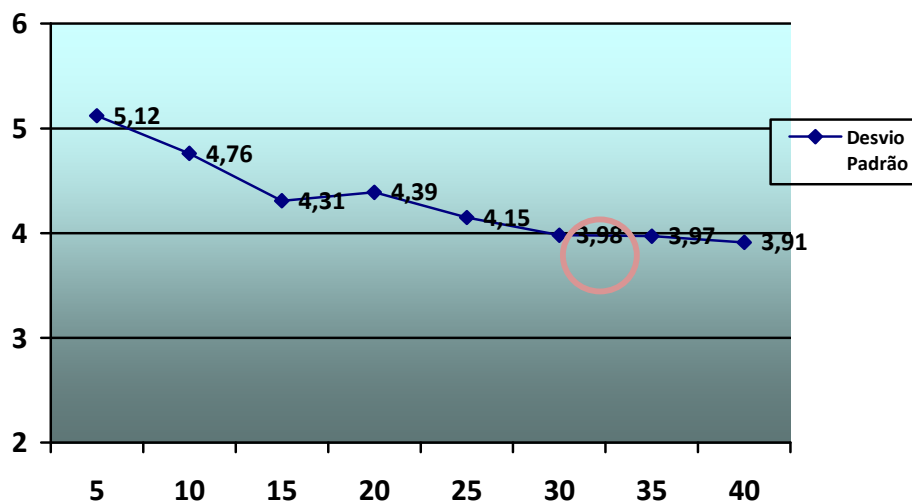
As secções de 4 μ m obtidas foram coradas pelo método de Hematoxilina e eosina sendo submetidas a estudo morfológico em microscopia de luz para identificação e contagem das células e corpos apoptóticos.

Reações de TUNEL foram realizadas para validar critérios morfológicos empregados para identificação e quantificação da apoptose no endométrio e implantes de endometriose.

DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE APOPTÓTICO

Inicialmente foi determinado o número mínimo de campos microscópicos necessários para se quantificar as células em apoptose. Para tanto, foram registrados o número de células em apoptose e os índices apoptóticos de 40 campos na mesma lâmina. Obtiveram-se assim, valores médios para 10 amostras de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 campos utilizados. Foi realizado um estudo dos desvios-padrão DP dos valores médios com relação ao tamanho da amostra que os originou. Os DP dos valores médios diminuem quando o número de campos microscópicos aumenta. Quando as oscilações de DP entre amostras consecutivas foram menores que 5%, não se justificava o acréscimo de número de campos, sendo então definido o número de campos necessários (36,37).

Gráfico 01 - Gráfico de avaliação da evolução do Desvio padrão das médias de células apoptóticas por número de campos contados.



O número mínimo representativo de campos microscópicos para determinação do Índice Apoptótico selecionados pelos dados do gráfico foi de 30 campos.

Após definição do número mínimo de campos necessários foi realizada a contagem, em todas as lâminas coradas com hematoxilina e eosina, em cada campo microscópico, do número total de células e o número de células sem apoptose. Os números de células apoptóticas obtidos em cada lâmina foram somados e este resultado foi dividido pela soma do número total de células obtido em todas as lâminas. Esse valor foi multiplicado por 100 resultando assim no índice apoptótico.

Para a contagem das células foi utilizado o programa analisador de imagens digitalizadas KS300; Kontron Elektronik. As imagens foram geradas por um microscópio (Zeiss Axiolab; Zeiss; Germany), usando objetiva de 100 x, conectado a uma câmera (JVC/ TK- 1270 ColorVideo Camera; Germany) que alimentou o computador através de um captador de imagens (“frame grabber”) em todo o processo (MiroMOVIE PRO; Germany).

FIGURA 03

Identificação da apoptose nos cortes corados em Hematoxilina- eosina

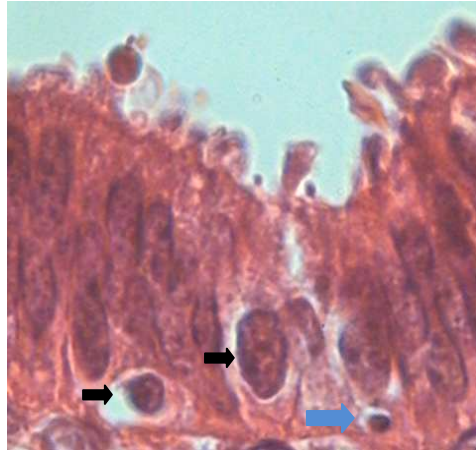


Figura 01

Figura 03 - Micrografia de endométrio mostrando a presença de células em apoptose. Notam-se, nas setas pretas, os núcleos retráidos com cromatina compacta. Identifica-se na seta azul um corpo apoptótico.(HE; objetiva 100X)

IDENTIFICAÇÃO IN SITU DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA SEGUNDO A TÉCNICA DE TUNEL

(Marcação in situ da fragmentação do genoma com transferase terminal
de doxinucleotídeo)

Utilizou-se um kit comercial para a detecção in situ da fragmentação do genoma (CALBIOCHEM - TDT - FragEL DNA fragmentation detection kit, QIA33. Esta etapa do estudo foi realizada no Laboratório de apoptose do Departamento de Patologia Geral do ICB- UFMG,.

Para definição do tempo da proteinase K, secções do tecido foram submetidas à ação da enzima na concentração de 2mg/ml em diferentes tempos: 5,8,10,15 e 20 minutos. Vinte minutos foi o tempo suficiente para

digerir as proteínas com ligações cruzadas, aumentando a permeabilidade e o acesso aos ácidos nucléicos alvo (DNA).

As lâminas foram lavadas em solução PBS 1x. Em seguida, a peroxidase endógena foi inativada, cobrindo-se as secções com água oxigenada a 3% em metanol, por 5 minutos. As lâminas foram novamente lavadas em PBS 1x e a seguir, cobertas com tampão de equilíbrio por 30 minutos a temperatura ambiente. A secção foi então coberta pela enzima TdT (transferase terminal de deoxinucleotídeo). As lâminas foram colocadas em atmosfera úmida a 37°C por 90 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS 1X e cobertas com o tampão de parada, no qual permaneciam por 5 minutos. As secções foram lavadas em PBS 1x e, logo após cobertas por tampão de bloqueio e incubadas por 10 minutos. As secções foram então tratadas com conjugado de peroxidase streptavidina diluído em tampão bloqueio. Incubaram-se os cortes em câmara umidificada por 30 minutos à temperatura ambiente. Lavaram-se as lâminas em PBS1X e cobriam-se as secções com tabletes de diaminobenzina – DAB e de H₂O₂ / uréia diluídos em água destilada por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente as lâminas foram lavadas em água destilada. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina-eosina.

Além da marcação específica – grumos amarronzados, revelados pela DAB, eram considerados características morfológicas de apoptose: enrugamento celular com projeções digitiformes da membrana, formação de corpos apoptóticos, convolução e fragmentação da membrana nuclear e compactação da cromatina em massas densas uniformes alinhadas no lado interno da membrana nuclear.

Em todas as baterias realizadas foi inserido um controle positivo e um negativo: lâminas de linfonodos caninos infectados com cinomose e lâminas nas quais não se usava a enzima tdt respectivamente.

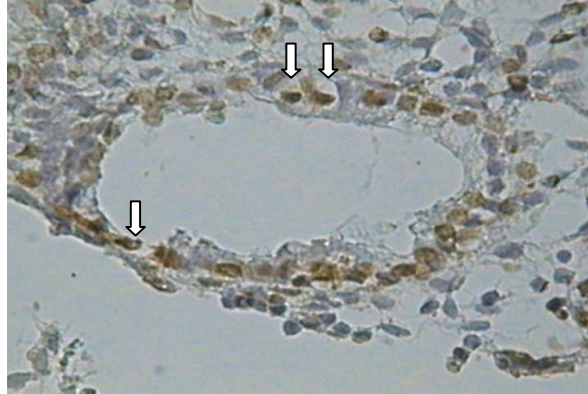


Figura 04 – Fotomicrografia :observar a marcação positiva para a fragmentação do genoma (TUNEL +) nas células epiteliais glandulares indicadas com a seta (TUNEL, contracoloração hematoxilina objetiva 40x)

ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO DA EXPRESSÃO DO bcl-2

A análise da expressão de bcl-2 foi realizada através de estudo imunoistoquímico realizado no Laboratório de apoptose do Departamento de Patologia Geral do ICB-UFMG e Laboratório do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG.

Cortes de 4 μ m foram colocados em lâminas de vidro tratadas com solução de acetona e silano. As secções foram desparafinizadas e hidratadas em soluções decrescentes de álcool etílico.

A ação da peroxidase endógena foi inativada através da incubação dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol durante 30 minutos. Foi realizada a recuperação antigênica utilizando-se o tampão utilizado Tris-EDTA com pH 8,0 e fonte de calor úmido em panela de vapor com temperatura entre 80° e 90° C por 25 minutos.

As ligações inespecíficas com biotina e avidina foram bloqueadas com uso de solução de leite em pó desnatado Molico (15g em 90ml de PBS).

Os cortes foram incubados com diluição de anticorpos monoclonais de camundongo antioncoproteína Bcl-2 humano (Dako Cytomation) clone 124 utilizando a diluição de 1:100 (vol/vol) de Ac anti-Bcl-2 por 30 minutos, em câmara úmida. Na seqüência, foi feita a incubação com o anticorpo secundário biotinilado contra imunoglobulina de camundongo (Kit LSAB cód -K0675 Dako Cytomation) por 20 minutos. Os cortes receberam a estreptavidina por 20 minutos e a visualização do complexo foi detectada com DAB (código – k3468 Dako Cytomation). A contracoloração utilizada foi hematoxilina.

A marcação positiva do Bcl-2 foi definida como identificação de coloração marrom citoplasmática. A presença e a intensidade da marcação foram avaliadas em 30 campos de cada corte. A imunoreatividade foi expressa como a porcentagem de células exibindo a imunomarcação. A intensidade foi descrita como (-) negativa se <3 células marcadas por campo, (+) positiva entre 3 e 8 células marcadas por campo e (++) fortemente positiva quando observadas mais de 8 células marcadas por campo (15,18).

Os controles negativos e positivos foram inseridos em todas as baterias. Os primeiros se constituíram de lâminas com endométrio que receberam soro em vez de anticorpo primário. Já os controles positivos constituíram-se de lâminas com cortes de apêndice.

O número final de lâminas para análise da imunoistoquímica consistiu em 10 lâminas. A diminuição de amostras se deveu ao desprendimento dos cortes nas lâminas durante a reativação antigênica e ao esgotamento dos anticorpos primários disponíveis para a análise.

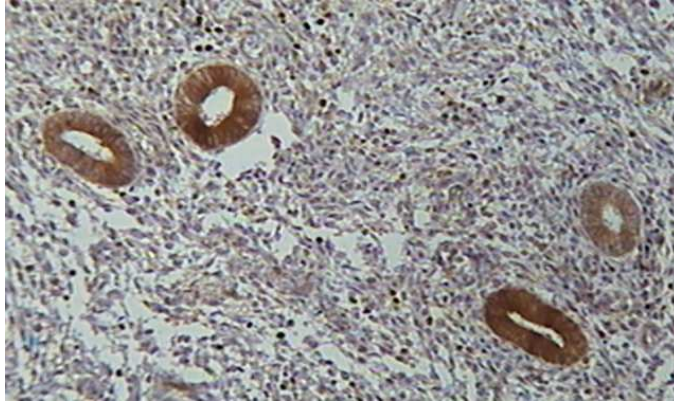


Figura 05 - Fotomicrografia com aumento de 40x no implante de endometriose mostrando reação fortemente positiva do *Bcl-2* nas glândulas endometriais contraindo Hematoxilina.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados obtidos foi utilizado o SPSS 15.0 e Minitab 15. Resultados com distribuição paramétrica foram comparados pelo Teste t de *Student* para avaliar eventuais diferenças entre as amostras. Resultados com distribuição não paramétrica foram comparados pelo teste de *Mann Whitney*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5- RESULTADOS

Para a análise final foram consideradas 8 pacientes portadoras de endometriose e 8 pacientes sem a doença, uma vez que 3 pacientes do grupo das portadoras foram excluídas do estudo.

A caracterização das 16 pacientes segundo a idade e características clínicas - dor pélvica crônica, dismenorréia e infertilidade encontram-se descritas nas tabelas 1 e 2.

Na tabela 1, observa-se que as pacientes portadoras de endometriose foram mais jovens que do grupo controle, o que pode ser conferido pela média e mediana da idade, com diferença significativa.

Tabela 1

Distribuição das pacientes de acordo com a idade e presença de endometriose

<u>Diagnóstico</u>	<u>Idade mínima</u>	<u>Idade máxima</u>	<u>Média*</u>	<u>Desvio-padrão</u>	<u>n</u>
Portadoras	24	46	34,8	6,67	8
Não portadoras	38	46	42,5	2,83	8

p =0,01*

* *Teste t student*

As pacientes portadoras de endometriose apresentaram maior frequência de dor pélvica crônica, dismenorréia e infertilidade quando comparadas àquelas sem a doença, conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2

Distribuição de dor pélvica crônica (DPC), dismenorréia e infertilidade			
Diagnóstico	Portadoras (n=8)	Não portadoras (n=8)	p*
Dor pélvica crônica	62,5% (5)	12,5% (1)	0,05
Dismenorréia	87,5% (7)	25% (2)	0,03
Infertilidade	75% (6)	12,5% (1)	0,02

**Teste de Fisher*

Com relação ao estadiamento cirúrgico, 50% (4) das pacientes foram classificadas como estadiamento grave, 25% (2) como moderado e 25% (2) como leve.

O Quadro 1 mostra que as pacientes portadoras de endometriose, em sua maioria, apresentavam-se no momento da coleta, na fase secretora do ciclo menstrual (75% fase secretora e 25% na fase proliferativa). No grupo das pacientes sem a doença não houve diferença na fase do ciclo menstrual (50% secretora e 50% na proliferativa).

Quadro 1

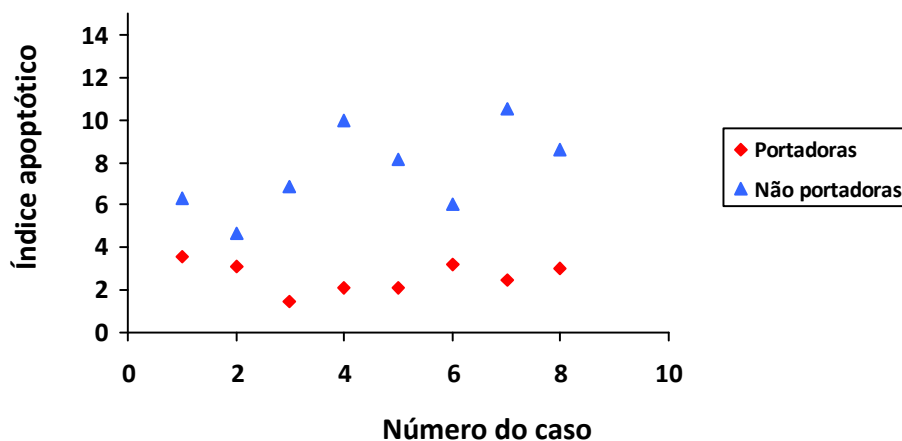
Diagnóstico	Fase do ciclo menstrual	
	Proliferativa	secretora
Portadoras	2	6
Não portadoras	4	4
TOTAL	6	10

COMPARAÇÃO DA APOPTOSE NOS IMPLANTES DE ENDOMÉTRIO ECTÓPICO DAS PACIENTES PORTADORAS DE ENDOMETRIOSE E NO ENDOMÉTRIO EUTÓPICO DAS PACIENTES NÃO PORTADORAS

No gráfico 2 estão descritos os índices apoptóticos (IA) apresentados pelas pacientes portadoras de endometriose e pacientes sem a doença.

Gráfico 2

Índice apoptótico das pacientes portadoras de endometriose e não portadoras

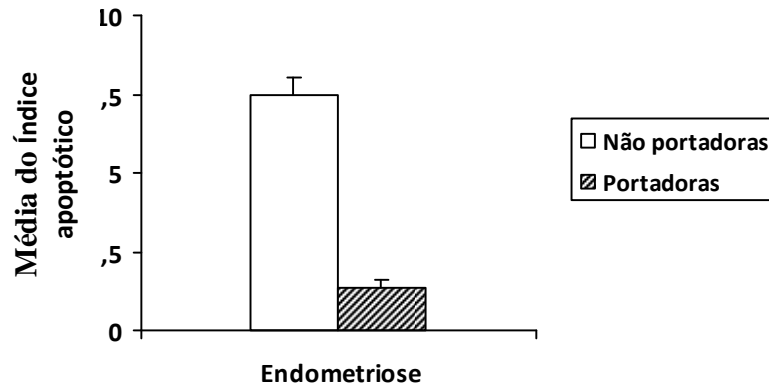


IA das pacientes portadoras foi inferior ao IA encontrado em todas as pacientes sem a doença

Ao se comparar o IA dos implantes de endométrio ectópico das pacientes portadoras de endometriose ($1,35 \pm 0,82$) com o IA do endométrio eutópico das pacientes do grupo controle ($7,5 \pm 2,02$), observou-se que houve diferença significativa ($p=0,001$) *Teste Mann Whitney* entre os grupos, como demonstrado no gráfico 3.

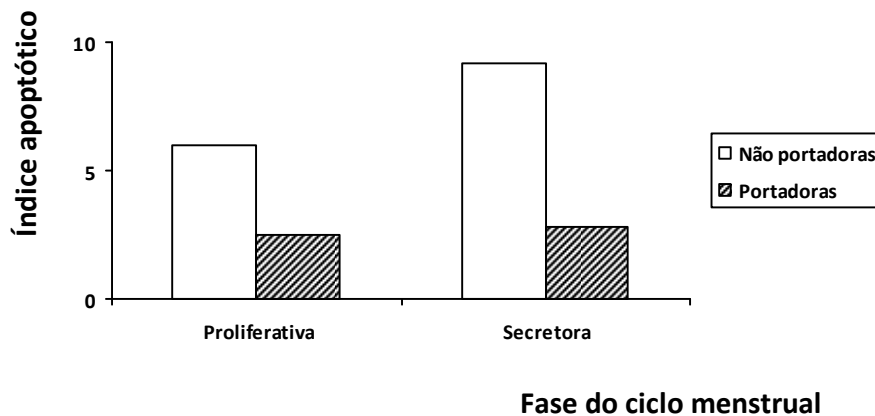
Gráfico 3

Comparação do IA no endométrio de pacientes sem a doença e nos implantes de endométrio de portadoras de endometriose



Quando avaliadas as fases do ciclo menstrual e os índices apoptóticos, foi observado maior IA nas pacientes não portadoras, em ambas as fases. Os índices da fase secretora foram superiores aos da fase proliferativa em ambos os grupos, e houve menor variação dos índices nas pacientes portadoras - como visto no gráfico 4.

Gráfico 4 - Avaliação do IA nas pacientes portadoras de endometriose e sem a doença nas fases proliferativa e secretora do ciclo menstrual



Com relação ao estadiamento da endometriose e o índice apoptótico, não foi identificada relação entre o IA e a gravidade da doença, tabela 5.

Tabela 3

Distribuição do índice apoptótico e estadiamento da endometriose.

Estadiamento	Índice Mínimo	Índice Máximo	Média*	Desvio-padrão	n
Leve	2,1	3,6	2,85	1,06	2
Moderada	1,45	2,5	1,9	0,74	2
Grave	2,85	3,2	3,0	0,5	4

$p=0,617$ *

* *Teste t student*

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BCL-2 NOS IMPLANTES
ECTÓPICOS E NO ENDOMÉTRIO EUTÓPICO DAS PACIENTES NÃO
PORTADORAS

O Quadro 2 descreve a expressão da proteína bcl-2 no grupo de pacientes portadoras de endometriose e nas pacientes sem a doença de acordo com a fase do ciclo menstrual.

Quadro 2

Descrição da expressão do bcl-2 nas fases do ciclo menstrual

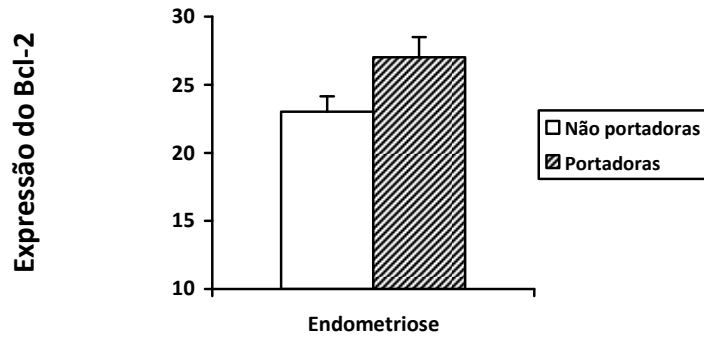
Fase proliferativa		Fase secretora	
Casos	Controles	Casos	Controles
E1) ++	C1) ++ C2) + C3) ++	E2) + E3) - E6) + E8) +	C4) - C8) -

(-) negativa <3 células marcadas por campo,
(+) positiva entre 3 e 8 células marcadas por campo e
(++) fortemente positiva quando observadas mais de 8 células marcadas por campo

Ao comparar a expressão de Bcl-2 entre as pacientes portadoras de endometriose (27 +-1,93) e as pacientes sem a doença (23 +- 1,56) não se observou diferença significativa entre os grupos $p > 0,05$ *Teste Mann-Whitney*.

Gráfico 5

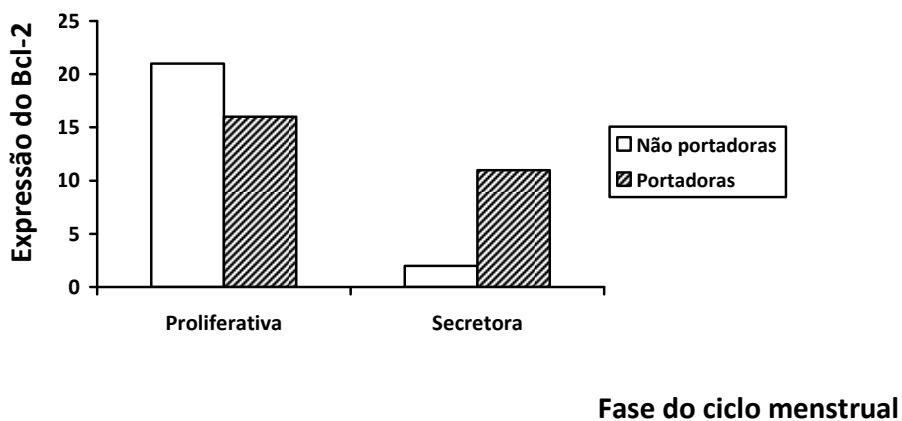
Expressão de bcl-2 no endométrio de pacientes sem a doença e nos implantes ectópicos



Ao se avaliar a expressão Bcl-2 e a fase do ciclo menstrual, constatamos que a expressão de Bcl-2 foi mais intensa na fase proliferativa em ambos os grupos. Houve menor variação da expressão de Bcl-2 entre as fases do ciclo nas pacientes portadoras de endometriose.

Gráfico 6

Comparação da expressão do Bcl-2 de acordo com a fase do ciclo nas pacientes sem a doença e nas portadoras



6 – DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, diversos estudos sobre a fisiopatologia da endometriose têm sido realizados. Motivados pelo impacto na qualidade de vida à qual estão submetidas as pacientes com a doença, estes estudos buscam superar as limitações das opções terapêuticas disponíveis atualmente.

Em 1998, foi avaliada, pela primeira vez, a apoptose no endométrio eutópico de mulheres sem endometriose e nos implantes ectópicos de pacientes portadoras da doença. Constatou-se que a susceptibilidade do tecido endometrial das pacientes com endometriose à apoptose era significativamente menor que nas pacientes sem a doença. (33).

O presente estudo teve como objetivo final a comparação da apoptose e a expressão da proteína Bcl-2 (Inibidora de apoptose) nos implantes de endométrio de pacientes portadoras de endometriose com o endométrio de pacientes sadias.

Foram selecionados para a coleta de amostras os focos brilhantes, de aspecto gelatinoso, rosados ou avermelhados, suavemente aderidos à serosa peritoneal, pois estes são considerados os mais jovens e com maior quantidade de glândula endometrial – fator indispensável para a realização deste estudo (20).

Houve a perda de 27% das amostras de lesões sugestivas de endometriose. Essa perda ocorreu por dois motivos principais: amostra não apresentava o número de campos mínimos necessários para a avaliação ou não se identificavam glândulas ou estroma endometrial para a comprovação da doença. A baixa associação entre a suspeita de endometriose durante a

cirurgia e o diagnóstico histológico é relatada por outros autores.

Marchino (2005) coletou 122 amostras histológicas de lesões suspeitas de endometriose em 54 cirurgias videolaparoscópicas em pacientes que apresentavam queixas de dor pélvica crônica, infertilidade ou dismenorréia. Porém, a presença de endometriose foi confirmada em apenas 54% destas amostras (39).

Hurtado (2008), em estudo abrangendo 68 mulheres que apresentavam lesões sugestivas de endometriose na cirurgia videolaparoscópica, observou confirmação histológica de lesões sugestivas de endometriose em apenas 38% das amostras coletadas (40).

O grupo de pacientes do estudo foi considerado não homogêneo com relação à idade $p=0,01$. Para a avaliação de um evento endometrial regulado pelos esteróides sexuais, como a apoptose, a presença de ciclos menstruais regulares e ausência de uso de medicações hormonais são os fatores de maior relevância para a comparação da homogeneidade entre os grupos. A exclusão das pacientes em uso de medicamentos como anticoncepcionais orais, terapia de reposição hormonal e inibidores de aromatase é indispensável. O uso dos mesmos encontra-se associado à diminuição da proliferação celular e aumento da apoptose nas pacientes (41,42). Os grupos das pacientes selecionadas apresentavam ciclos regulares e não faziam uso de nenhuma medicação hormonal, não havendo restrição para sua comparação.

Entre as pacientes portadoras de endometriose, 6 (75%) mulheres encontravam-se na fase secretora do ciclo menstrual e 2 (25%) na fase proliferativa. A seleção de maior número de mulheres portadoras de endometriose na fase secretora do ciclo menstrual é sugerida, uma vez que na fase proliferativa encontram-se apenas esporádicas células apoptóticas e

na fase secretora esse número aumenta consideravelmente (18,19).

Na tabela 2 foi demonstrada a maior prevalência dos sintomas de dor pélvica crônica, dismenorréia e infertilidade no grupo das pacientes portadoras de endometriose. Tais sintomas são descritos como de prevalência aumentada nas portadoras de endometriose por diversos autores (2,3,5,8)

O estadiamento da endometriose, proposto em 1985 pela Sociedade Americana de Fertilidade e revisado em 1996 pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva procura classificar a doença de acordo com a extensão de acometimento da pelve, considerando a presença de lesões e de aderências peritoneais e ovarianas. Ao se realizar o estadiamento da endometriose, observamos que a maior parte do grupo se constituiu de mulheres com estágio moderado e grave da doença. Entretanto, não houve diferença significativa entre o índice apoptótico e a gravidade da doença.

Dmowski (1998) analisando 11 portadoras de endometriose sugeriu que o índice apoptótico era superior nas pacientes com estágios mais avançados da doença. Gebel (1998) apresentou resultados semelhantes, com menores índices apoptóticos nas pacientes em estágio III e IV. Entretanto as diferenças, em ambos, não apresentaram significado estatístico, talvez pelo pequeno número de casos, como no presente estudo (12).

O fato das células do endométrio eutópico de pacientes com endometriose apresentarem modificações e estas não serem observadas no endométrio de pacientes sem a doença, sugere que o defeito primário da endometriose possa estar presente no endométrio eutópico. Sendo assim, muitos dos estudos encontrados para esta revisão comparam o endométrio eutópico de mulheres sadias com o endométrio de portadoras de endometriose ou os implantes ectópicos com o endométrio eutópico das portadoras

(11,13,15,16,19,21,43,44).

Existem poucos estudos disponíveis comparando o endométrio eutópico de mulheres sadias com os implantes ectópicos das pacientes portadoras de endometriose. Foram identificados apenas 4 estudos, que envolveram um total de 125 mulheres (12,18,33,34).

Em presente estudo, o índice apoptótico do endométrio eutópico das pacientes sadias foi maior que o encontrado nos implantes ectópicos. Desta forma, constatou-se menor susceptibilidade dos implantes de endométrio ectópico à apoptose.

Dmowski (2001), Gebel (1998) e Béliard (2004) demonstraram que a apoptose dos implantes ectópicos foi significativamente menor que a encontrada no endométrio tópico do grupo controle (12,33,34).

Contrariamente, Jones (1998), ao avaliar a apoptose, não identificou diferença significativa entre implantes ectópicos de portadoras de endometriose e amostras de endométrio eutópico de pacientes sadias. Este autor descreve que foi possível avaliar a apoptose em apenas 3/30 (10%) dos implantes ectópicos, o que pode ter dificultado sua análise estatística (18).

O índice apoptótico foi maior, embora sem significado estatístico, na fase secretora do ciclo em ambos os grupos. Hopwood (1976), no primeiro estudo da apoptose no endométrio, encontrou a presença de corpos apoptóticos principalmente na fase secretora do ciclo. Concluiu que os esteróides ovarianos podem controlar a apoptose endometrial e seu resultado foi posteriormente confirmado por outros autores (23,28,32).

No grupo das portadoras de endometriose, os implantes ectópicos não apresentaram diferença significativa do índice apoptótico entre as fases do

ciclo. Esse resultado sugere que, talvez, o controle da apoptose não esteja relacionado apenas com os níveis hormonais nos implantes endometrióticos.

Béliard (2004), Dmowski (2001) e Gebel (1998) também não identificaram diferença do índice apoptótico entre as fases do ciclo menstrual em implantes ectópicos de pacientes portadoras de endometriose (12,33,34).

Para a descrição da expressão de Bcl-2, utilizou-se a avaliação semi-quantitativa, como descrita por outros autores (12,15). Foi identificada maior expressão de Bcl-2 no grupo das pacientes portadoras de endometriose, embora sem diferença significativa.

Jones (1998) e Béliard (2004), diferentemente, constataram diferença na expressão de Bcl-2 entre os implantes endometrióticos e endométrio tópico (18,34).

Braun (2007), não observou diferença na expressão de Bcl-2 ao comparar os implantes endometrióticos com o endométrio tópico das pacientes sem a doença. Neste estudo foi avaliada também a expressão dos oncogenes Bclx longo (antiapoptótico) e Bclx curto (pró- apoptótico). Para estes genes foi identificada diferença da expressão entre os implantes endometrióticos e endométrio dos controles, com aumento do Bclx longo nas pacientes portadoras de endometriose (34). Tao (1997) ao analisar a regulação da apoptose no endométrio, constatou que esta é determinada não apenas pela expressão de um gen, mas pelo balanço da expressão dos genes indutores da morte celular como o bcl-2 e bcl-x longo e dos inibidores como o bax e bcl-x curto (27).

No presente estudo, expressão de Bcl-2 foi mais intensa na fase proliferativa em ambos os grupos. Devido ao pequeno número de pacientes do grupo de portadoras (n=1) na fase proliferativa, não foi possível a análise

estatística da expressão da proteína e fase do ciclo menstrual.

McLaren (1997), Gompel (1994) e Jones (1998) descreveram a expressão de Bcl-2 mais intensa na fase proliferativa do ciclo menstrual (18,28,29).

Com base nos resultados apresentados constatou-se que os implantes de endométrio ectópico de pacientes com endometriose apresentam alteração na regulação da apoptose. Porém, não houve diferença significativa na expressão de Bcl-2 entre os grupos. A diminuição da ocorrência da apoptose pode resultar em sobrevivência anormal das células endometriais, sendo um dos fatores associados à patogênese da endometriose (12,20,35).

A patogenia da endometriose permanece ainda obscura. A descoberta dos mecanismos desencadeadores ou facilitadores da doença pode permitir, no futuro, a criação de novas drogas com ação específica e com melhores resultados do que os que são obtidos atualmente com o tratamento convencional. Assim, pode-se destacar presente estudo como possível contribuição para a melhora no entendimento da patogênese da endometriose e no desenvolvimento de tratamentos mais eficazes que possam melhorar a qualidade de vida das mulheres com esta doença.

7 - CONCLUSÃO

Os implantes ectópicos apresentam deficiência no processo de morte celular via apoptose quando comparados com o endométrio tópico de pacientes sem endometriose.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Harada T, Kaponis A, Iwabe T, *et al.* Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Up.* 2004;10:29-38.
- 2 - Orazi VD, Cosson M and Dufour P. Theories of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001;96:21 -34.
- 3 – Bulun S. Mechanisms of disease: endometriosis. *N Eng J Med.* 2009;360:268-279.
- 4 - Missmer SA, Crammer WD. The epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin N Am.* 2003;30:1-19.
- 5 - ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod.* 2005;20(10):2698-2704.
- 6- Osteen KG, Kaylon BTL, Eisenberg E. Endometrial biology and the etiology of endometriosis. *Fertil Steril.* 2005;84:33-34.
- 7 – Laschke MW, Menger M. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Rep Up.* 2007;13(4):331-342.
- 8– Seli E, Berkkanoglu M, Arici A. Pathogenesis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin N Am.* 2003;30:41-61.
- 9 – Johnson MC, Torres M, Alves A, *et al.* Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: expression of c-myc, TGF-beta 1 and bax genes. *Rep Bio Endoc.* 2005;3(45):1-8.

- 10 - Braun DP, Ding J, Shen J, *et al.* Relationship between apoptosis and the number of macrophages in eutopic endometrium from women with and without endometriosis. *Fertil Steril.* 2002;78(4):830-835.
- 11– Vinatier D, Cosson M, Dufourd P. Is endometriosis an endometrial disease? *Eur J Obst Gynecol Rep Biol.* 2000;91:113-125.
- 12- Braun DP, Dmowski PW. Decreased apoptosis and sensitivity to macrophage mediated cytolysis of endometrial cells in endometriosis. *Hum Rep Up.* 1998;4:696-701.
- 13– Ulukus M, Cakmak H, Arici A. The role of endometrium in endometriosis. *J Soc Gynecol Investig.* 2006;13:467-476.
- 14– Sharpe-Timmis KL. Defining endometrial cells: the need for improved identification at ectopic sites and characterization in eutopic sites for developing novel methods of management for endometriosis. *Fertil Steril.* 2005;84:35-37.
- 15 -Meresman FG, Vighi S, Buquet AR, *et al.* Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2000;74: 760 – 766.
- 16– Suganuma N, Harada M, Furuhashi M. Apoptosis in human endometrial and endometriotic tissues. *Horm Res.* 1997;48(suppl 3):42-47.
- 17 -Tao XJ, Sayegh RA, Tilly JL, *et al.* Elevated expression of the proapoptotic Bcl -2 family member, Bak, in the human endometrium coincident with apoptosis during the secretory phase of the cycle. *Fertil Steril.* 1998;70:338 – 343.

18 - Jones RK, Searle RF and Bulmer NJ. Apoptosis and Bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. Hum Reprod. 1998;13:3496 -3502.

19 – Szymanowisk K. Apoptosis pattern in human endometrium in women with pelvic endometriosis. Eur J Obstet Gynecol Rep Bio. 2007;132:107-110.

20– Donnez J, Squifflet J, Pirard C, *et al.* Typical and subtle atypical presentations of endometriosis. Obstet Gynecol Clin N Am. 2003;30:83– 93.

21– Micini F, Tiberi F, Tropea A, *et al.* Paracrine regulation of endometriotic tissue. Gynecol Endo. 2007;23(10):574-580.

22 – Matuszaki S, Canis M, Pouly JL, *et al.* Differential expression of genes in eutopic and ectopic endometrium from patients with ovarian endometriosis. Fertil Steril. 2006;86(3):548-553.

23– Anaf V, Chapron C, Nakadi IE, *et al.* Pain, mast cells, and nerves in peritoneal, ovarian and deep infiltrating endometriosis. Fertil Steril. 2006;86:1336-1343.

24 - Tao JX, Tilly IK, Maravel DV, *et al.* Differential expression of members of the bcl-2 gene family in proliferative and secretory human endometrium: glandular epithelial cell apoptosis is associated with increased expression of bax. J Clin Endocrinol and Metab. 1997;82:2738 – 2746.

25 - Moro L. Apoptose na patogenia da cinomose canina (Tese Doutorado) - Faculdade de Medicina UFMG, Belo Horizonte,2001.

26 - O'Reilly LA and Strasser A. Apoptosis and autoimmune disease. Inflamm Res. 1999;48:5- 21.

27 - McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, *et al.* Immunolocalization of the apoptosis regulating proteins Bcl-2 and Bax in human endometrium and isolated peritoneal fluid macrophages in endometriosis. *Hum Reprod.* 1997;12:146-152.

28 - Gompel A, Sabourin JC, Martin HY, *et al.* Bcl-2 expression in normal endometrium during the menstrual cycle. *Am J Pathol.* 1994;6:1195 – 1202.

29 - Silva MB. Ultra-estrutura do endométrio da rata após castração: autofagocitose e apoptose. (Tese de Mestrado) - Faculdade de Medicina UFMG, Belo Horizonte, 1998.

30 - Hopwood D, Levison AD. Atrophy and apoptosis in cyclical human endometrium. *J Pathol.* 1976;119:159-166.

31 - Gebel MH, Braun DP, Tambur A, *et al.* Spontaneous apoptosis of endometrial tissues impaired in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 1998;69:1042 – 1047.

32– Béliard A, Noel A, Foidart JM. Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertil Steril.* 2004;82:80-85.

33– Braun DP, Ding J, Shaheen F, *et al.* Quantitative expression of apoptosis-regulating genes in endometrium from women with and without endometriosis. *Fertil Steril.* 2007;87(2):263-268.

34– The American Fertility society. Revised American Fertility Society classification of endometriosis. *Fertil Steril.* 1997;67(5):817-21.

35 - Roberts CP, Rock JA. The current staging system for endometriosis: does it help? *Obstet Gynecol Clin N Am.* 2003;30:115-132.

36- Sampaio IBM. Estatística Aplicada a Experimentação Animal. 1ª ed. Belo Horizonte: *Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia*, 1998.

37 - Moro L, Vasconcelos AC, Santos FGA *et al.* Determination of the minimal representative number of microscopical fields to quantify apoptosis in canine lymph nodes. *Arq bras med vet zootec.* 2004; 56:408-410.

38 - Kerr MR, WYLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological pneumonia with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26: 239- 257.

39 - Marchino GL, Gennareli G, Henria R *et al.* Diagnosis of pelvic endometriosis with use of macroscopic versus histologic findings. *Fertil Steril.* 2005;84:12–5.

40 - Hurtado R. Análise inter e intra-observador no diagnóstico anátomo-patológico endometriose

41 - Meresman G, Augé L, Barañao IR *et al.* Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertil Steril.* 2002;77:1141–7.

42 – Meresman G, Bilotas M, Abello V *et al.* Effects of aromatase inhibitors on proliferation and apoptosis in eutopic endometrial cell cultures from patients with endometriosis. *Fertil Steril.* 2005;84:459–63.

43 - Timms KL. Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Ann NY Acad Sci.* 2001;943:131 – 147.

44 – Tabizadeh S, Kong Q, Satayaswaroop P *et al.* Signals and molecular pathways involved in apoptosis, with special emphasis on human endometrium. *Hum R Up.* 1995;1(4):303-323.

9. ANEXOS
