
SILVIA HELENA MAGALHÃES STOCKLER RIACHI

**IMUNOEXPRESSÃO DA ENZIMA AROMATASE P450 EM
ESPÉCIMES CIRÚRGICOS DE MULHERES PORTADORAS
DE ENDOMETRIOSE PÉLVICA PROFUNDA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da
Santa Casa de São Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Medicina

São Paulo
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SILVIA HELENA MAGALHÃES STOCKLER RIACHI

**IMUNOEXPRESSÃO DA ENZIMA AROMATASE P450 EM
ESPÉCIMES CIRÚRGICOS DE MULHERES PORTADORAS
DE ENDOMETRIOSE PÉLVICA PROFUNDA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Medicina

Área de Concentração: Tocoginecologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo A. Ayroza Galvão Ribeiro
Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Antonieta Longo Galvão Silva

São Paulo
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pela Biblioteca Central da
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**

Riachi, Silvia Helena Magalhães Stockler
Imunoexpressão da enzima aromatase P450 em espécimes
cirúrgicos de mulheres portadoras de endometriose pélvica profunda./
Silvia Helena Magalhães Stockler Riachi. São Paulo, 2008.
Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da
Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-Graduação em Medicina.
Área de Concentração: Tocoginecologia
Orientador: Paulo Augusto Ayroza Galvão Ribeiro
Co-Orientador: Maria Antonieta Longo Galvão Silva

1. Endometriose/diagnóstico 2. Endometriose/terapia 3. Análise
serial de tecidos 4. Aromatase 5. Imunoistoquímica 6. Dor pélvica

BC-FCMSCSP/82-08

DEDICATÓRIA

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

Fernando Pessoa

*Aos meus pais, **NOBRE** e **MARIA HELENA**, pelo amor incondicional e dedicação constante que formaram a mulher que sou.*

*Aos meus avós, **EDGARD** (in memoriam) e **HELENA**, que, por seu exemplo, guiaram meus passos.*

*A minha irmã, **HELOISA**, com quem dividi minhas alegrias e tristezas ao longo destes anos.*

“O amor nada dá senão de si próprio e nada recebe senão de si próprio. O amor não possui, nem se deixa possuir, pois o amor basta-se a si mesmo”.

Gibran Khalil Gibran

*Ao meu amado marido **MICHEL**, o amor de minha vida...*

*A doce **CATARINA**, filha querida e vida deste amor.*

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. Paulo Augusto Ayroza Galvão Ribeiro**, meu orientador, pela incomensurável paciência e compreensão na realização deste trabalho, além do profissionalismo que tanto admiro.

À **Prof. Dra. Maria Antonieta Longo Galvão Silva**, pela acolhida e oportunidade de realizar um grande sonho. Seus ensinamentos e sua docilidade sempre estarão em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Tsutomu Aoki**, Chefe do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Santa Casa de São Paulo, pelos momentos de apoio e ensino contribuindo de forma indescritível ao nosso saber.

Ao **Prof. Dr. Antônio Pedro Flores Auge**, pelo desprendimento de compartilhar sua sabedoria e experiência conosco.

À **Dra. Nilka Fernandes Donadio**, pelos preciosos conselhos que geriram minha vida profissional e pessoal.

À **Dra. Agilda Barros Conceição Meira**, pelas valiosas contribuições em minha formação médica e apoio constante ao longo destes anos.

Ao **Prof. Dr. Reginaldo Guedes C. Lopes** pela oportunidade e apoio nas atividades do IAMSPE- Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual.

Aos **Profs Drs. Nilson Donadio, Sônia Maria Rosa Rolim Lima e Eduardo Schor**, pela atenção dispensada por ocasião do Exame Geral de Qualificação.

Aos **Drs. Gil Kamergorodsky, Adolpho Kelm Júnior, Cláudio Severino e Helizabet Salomão Abdalla Ayroza Ribeiro**, médicos assistentes da Clínica de Endoscopia Ginecológica e Endometriose da Santa Casa de São Paulo, pelos ensinamentos e apoio nas atividades da vida acadêmica.

Aos **colegas**, do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Santa Casa de São Paulo, pelo apoio constante ao longo destes anos de minha formação.

Às **Dras. Andrea Regina de Campos Peçanha, Alessandra Mollo de Campos Machado, Daniela Barros de Souza Meira e Camila Venneri Mathias**, que mais do que colegas são amigas para todos os momentos de minha vida.

Às **pacientes**, sem as quais nada do que fazemos teria sentido.

LISTA DE ABREVIATURAS

AFS: *American Fertility Society*

C19: Carbono 19

COX 2: Ciclooxygenase tipo 2

DOGI: Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

ESHRE: *European Society of Human Reproduction and Embriology*

FCMSCSP: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

FSH : Hormônio folículo estimulante

GnRH: Hormônio de liberação das gonadotrofinas

HE: hematoxilina e eosina

HLA: *human leukocyte antigens*

ISCMSP: Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

IL : interleucina

kb: kilobases

mm: milímetros

µm: micrômetro

MMPs: matrix metaloproteinases

P450arom: aromatase P450

PG : prostaglandina

PGE2: prostaglandina E dois

PGF2α: prostaglandina E dois alfa

RNA_m: *Messenger ribonucleic acid*

TMA: *tissue microarray*

UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – Esteroidogênese	10
1.2 – Aromatase	12
1.3 - Aromatase e Endometriose	14
2. OBJETIVOS	19
3. CASUÍSTICA E MÉTODO	21
3.1 – Casuística	22
3.1.1 – Critérios e inclusão e exclusão	23
3.2 – Método	24
3.2.1 – Avaliação histopatológica	24
3.2.2 – TMA	24
3.2.3 – Estudo imunoistoquímico	27
3.2.4 – Critérios de avaliação da expressão de aromatase	27
3.3 – Análise Estatística	29
4. RESULTADOS	36
4.1 – Dados epidemiológicos	31
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÕES	45
7. ANEXOS	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
FONTES CONSULTADAS	65
RESUMO	67
ABSTRACT	69
APÊNDICE	71

1. INTRODUÇÃO

A endometriose é uma das doenças ginecológicas mais enigmáticas, sendo classicamente caracterizada pela presença de células endometriais, estromais ou epiteliais, fora da cavidade uterina. Este endométrio ectópico encontra-se em localizações extra uterinas como ovários, peritônio e outros órgãos pélvicos, além de localizações extra pélvicas, como o trato intestinal, ureter, dentre outros (Wheeler, 1989; Eskenazi, Warner, 1997). Mais recentemente, seguindo a orientação da *European Society of Human Reproduction and Embriology* (ESHRE), conceitua-se a enfermidade como a presença, fora do útero, de tecido semelhante ao endométrio e que induz a inflamação crônica (Kennedy *et al*, 2005).

Esta moléstia pode manifestar-se de múltiplas formas, sendo dor pélvica e infertilidade os achados mais comuns. De todos os seus variados sintomas a dismenorréia é observada com maior freqüência, independentemente de sua localização, podendo apresentar ainda alterações do padrão menstrual, dispareunia profunda, dor pós-coito e algia pélvica contínua (Wheeler, 1989). Trata-se de uma das doenças crônicas ginecológicas mais freqüentes na idade reprodutiva, sendo sua prevalência estimada em 2 a 10% das mulheres no menacme, podendo chegar até 30% em mulheres inférteis (Eskenazi, Warner, 1997; Barbosa, 1999; Hompes,

Mijatovic, 2007). Sua prevalência na população geral oscila na literatura de 1% a 50% nas mulheres que são submetidas a cirurgias ginecológicas modificando-se de acordo com o quadro clínico, os sintomas e a indicação da intervenção; naquelas com dor pélvica crônica estima-se em 14% de prevalência, enquanto em infertilidade sem causa aparente pode chegar a 33% (Olive, Schwartz, 1993).

Constitui-se um agravo de saúde pública com impacto na qualidade de vida das mulheres, podendo levar a longos períodos de internação e afastamento social e profissional, além de gastos excessivamente altos com medicamentos, tendo, portanto um impacto econômico mundial (Eskenazi, Warner, 1997).

Quanto à sua etiologia a endometriose é vista como uma enfermidade de origem poligênica, multifatorial complexa e com patogênese ainda não completamente elucidada (Olive, Schwartz, 1993).

O implante de células endometriais tópicas na superfície peritoneal através da menstruação retrógrada – teoria defendida por Sampson em 1927 – é uma das explicações mais aceitas para o desenvolvimento da endometriose pélvica peritoneal (Sampson, Albany, 1927). O mesmo autor também relata a presença de aderências extensas no recesso retro uterino, obliterando-o por completo, ressaltando que a lesão do tipo endometrial invadia o tecido uterino e a parede anterior do reto (Sampson, Albany, 1927).

Devido às evidências experimentais e à observação de que quase todas

as mulheres eumenorrêicas apresentam refluxo menstrual através de suas tubas uterinas, os mecanismos pelos quais só algumas mulheres desenvolvem a doença não estão bem elucidados (Sampson, Albany, 1927). Sugere-se que haja envolvimento de alterações moleculares das células endometriais heterotópicas e sua antigenicidade, ou seja, sua capacidade de interagir com a resposta imunológica local (Braun, Dmowsky, 1998; Somigliana *et al*, 1999). Mais ainda, diversos autores defendem a alteração genética do endométrio tópico que tornariam este tecido mais susceptível à migração - teoria metastática (D'Amora *et al*, 2006; Carvalho *et al*, 2007; Schor *et al*, 2008). Dentre as múltiplas alterações imunológicas relatadas na literatura ressaltamos a importância de evidências a favor de: modificação na expressão de antígenos HLA classe I, necessários para apresentação antigênica (Semino *et al*, 1995); produção de antígenos circulantes que competem com os antígenos endometriais no reconhecimento imune (Sutton *et al*, 1994; De Placido *et al*, 1998); secreção direta ou indireta de fatores de crescimento e citocinas, como o fator de crescimento β e a prostaglandina E2 (PG E2), que inibem funções linfocitárias específicas (Viganö *et al*, 1998); indução da apoptose de células imunológicas através de mecanismos Fas-mediados (Garcia-Velasco *et al*, 1999). Defeito na atividade das células *natural killer*, levando à diminuição da resposta celular imune, pode alterar a fagocitação realizada pelos macrófagos que perdem, então, sua capacidade de depurar a pelve do efluxo menstrual. Outros fatores são a presença de altos níveis de fator de necrose tumoral α e interleucina-8 também envolvidos no processo de angiogênese (Nisolle, Donnez, 1997).

Primeiramente as células endometriais devem atingir a cavidade peritoneal, e as células deste refluxo menstrual devem ser capazes de se implantar em estruturas pélvicas. Um amplo número de proteínas adesivas e proteoglicanos estão bioquimicamente envolvidos neste processo, como as lamininas e a fibronectina (Nisolle, Donnez, 1997). As integrinas são as principais glicoproteínas que agem como receptores na superfície celular para as proteínas da matriz extracelular. A expressão de algumas integrinas já foi descrita no endométrio normal com importante papel na interação de elementos glandulares e estromais como relatado inicialmente por Beliard *et al*, em 1997. A invasão por fragmentos endometriais no peritônio pode ser explicada pela presença de tais moléculas de adesão. Defeitos nesta interação levariam ao desenvolvimento da endometriose através da síntese e ativação da matrix metaloproteinases (MMPs), causando rompimento tecidual e aumentando a capacidade de invasão das células endometriais heterotópicas (Beliard *et al*, 1997; Nisolle, Donnez, 1997).

A MMPs compreende um dos maiores grupos de proteases envolvidas na etiologia e patofisiologia da endometriose (Nothnick, D´Hooghe, 2003). No endométrio normal a MMPs é o mediador da degradação da matrix extracelular facilitando a quebra tecidual e os processos de reparo no período menstrual. Alterações na expressão da MMPs podem contribuir para doenças associadas com a degradação da matriz extracelular, como a endometriose (Osteen *et al*, 1997).

Outra teoria baseia-se na capacidade de ocorrer metaplasia nos tecidos derivados dos ductos de Muller, e foi sugerida pela incapacidade da teoria da

implantação em explicar alguns casos como a endometriose em homens, ou mulheres com anomalias genitais que não têm menstruação retrógrada (Meyer, 1919; Doty *et al*, 1980; El-Mahgoub, Yaseen, 1980; Acien, 1986; Koninckx *et al*, 1999). Esta teoria é suportada também pela observação experimental de que restos menstruais ou fragmentos de endométrio autólogo transplantados podem induzir metaplasia endometrial ou endometriose em diferentes tecidos (Merrill, 1966).

Há ainda uma terceira teoria, dentre outras muitas sugeridas, que defende a combinação das duas anteriores, conhecida como teoria da indução. Baseia-se na indução do mesênquima indiferenciado para transformar-se em tecido endometriótico através de fatores locais desconhecidos (Merrill, 1966; Olive, Schwartz, 1993).

Concomitantemente, outros autores centraram seus estudos nos aspectos imunológicos sistêmicos e nos fatores locais do peritônio que podem estar envolvidos tanto na histogênese como nas seqüelas causadas pela endometriose (Weed, Arquembourg, 1980; Muscato *et al*, 1982; Badaway *et al*, 1984; Steele *et al*, 1984). Assim, Oosterlynck *et al*, em 1991, demonstraram que pacientes portadoras de endometriose apresentam deficiência na atividade dos linfócitos *natural killer*, o que resulta em diminuição da imunidade celular.

Em 1997 Nisolle e Donnez sugeriram a existência de três formas distintas de endometriose: endometriose peritoneal, endometriose ovariana e endometriose do septo reto-vaginal. Segundo os autores a doença profunda,

do septo retovaginal, teria na sua histologia semelhanças com um nódulo adenomiótico: um agregado nodular de fibras musculares, epitélio glandular e estroma. A invasão de tecido muscular por epitélio glandular ativo sem o estroma mostra que esta apresentação da endometriose é muito semelhante a adenomiose sugerindo sua origem conjunta.

Outros autores conceituam a endometriose profunda como aquela que ultrapassa 5 mm de profundidade em relação à superfície peritoneal (Cornillie *et al*, 1990; Koninckx, Martin, 1992) e a classificam em 3 tipos de lesão (Koninckx *et al*, 1994): as lesões do tipo I são cônicas, com a base voltada para a cavidade peritoneal, o que indica uma provável patogenia infiltrativa; as lesões do tipo II são caracterizadas por grandes distorções da anatomia pélvica devido a grandes e grosseiras aderências de alças intestinais cobrindo a lesão; e as lesões do tipo III, caracterizadas por uma área profunda maior de lesão endurecida recoberta por peritônio normal ou com pequenas lesões pigmentadas, aspecto que leva a crer que este tipo de lesão seja causada por infiltração de adenomiose externamente (Koninckx, Martin, 1992; Koninckx *et al*, 1994). A doença profunda tem peculiaridades como o sincronismo com o endométrio tópico e sua característica de progressão com o passar dos anos, atingindo habitualmente além do septo retovaginal, os ligamentos útero sacrais, vagina e segmentos de reto e sigmóide (Cornillie *et al*, 1990).

Apesar da vasta e conhecida sintomatologia a endometriose ainda tem seu diagnóstico baseado na histologia, o que reitera a necessidade de abordagem cirúrgica videolaparoscópica para identificação das lesões e coleta de fragmentos teciduais que orientem o tratamento (Chatman, 1981; Izzo *et*

al, 1984; Jansen, Russel, 1986).

Não obstante, apesar da excelente visualização da cavidade peritoneal com o emprego da videolaparoscopia, em algumas situações a lesão pode não ser adequadamente identificada. (Perry, Mena, 1995). Destarte deve-se reforçar o papel da anamnese, buscando sinais sugestivos de doença profunda – dispareunia profunda, dor pós-coital, dor pélvica contínua – ou do comprometimento intestinal - tenesmo, defecação dolorosa, sangramento intestinal no período menstrual (Mahmood *et al*, 1991; Perry, Mena, 1995). Tais sintomas servem de guia para o emprego de métodos diagnósticos mais precisos.

Assim, reforçamos a necessidade do emprego de métodos diagnósticos complementares na investigação pré-operatória da endometriose pélvica profunda. O ultra-som transvaginal, tradicionalmente utilizado para avaliação das alterações anexiais, pode em algumas circunstâncias não identificar o comprometimento dos ligamentos útero sacrais, recesso retro uterino, septo retovaginal e segmentos de reto-sigmóide (Dumontier *et al*, 2000; Umária, Olliff, 2001; Abrão *et al*, 2007; Bazot *et al*, 2007). Desta forma, a Ressonância Magnética da pelve tem-se difundido pela sua alta capacidade de diferenciação tissular dos órgãos pélvicos, além da identificação precisa da topografia da lesão (Martin *et al*, 1999).

Mais recentemente, em nosso meio o ultra-som endoscópico trans-retal passou a ser empregado no diagnóstico do acometimento intestinal e retro cervical, originando uma classificação anatômica para endometriose

pélvica profunda com precisa identificação do segmento intestinal acometido, sua extensão e profundidade da lesão (Ribeiro *et al*, 2002; Ribeiro *et al*, 2008).

A endometriose tem, portanto, uma complexa patogenia e diferentes formas de manifestação. Sabe-se que é mais prevalente em mulheres na idade reprodutiva e tende a regredir após a menopausa ou ooforectomia bilateral sugerindo tratar-se de uma afecção estrógeno-dependente (Kitawaki *et al*, 1997).

Quanto aos fatores indutores, conhecia-se exclusivamente o mecanismo endócrino de ação do estradiol, sintetizado no ovário ou no tecido adiposo, e que através da circulação sanguínea atinge seus órgãos-alvo exercendo, assim, seus efeitos. Porém, estudos vêm demonstrando que, em certas morbidades como o câncer de mama (Bulun *et al*, 1993), a miomatose uterina (Sumitani *et al*, 2000) e a endometriose (Bulun *et al*, 1994; Noble *et al*, 1996; 1997), a produção e a secreção de estrógeno *in situ* pode ter um papel fundamental no desenvolvimento e progressão da doença (Witz,1999). Avaliando-se a ação da aromatase em segmentos de quadrantectomia obtidos de mulheres com câncer de mama notou-se crescimento de células epiteliais malignas, sugerindo um efeito autócrino do estrogênio (Bulun *et al*, 1993; Moretão *et al*, 2001).

1.1 - Esteroidogênese

Os esteróides sexuais, assim como os estrogênios, têm origem na molécula do colesterol, principalmente o LDL-colesterol. Grande porção deste LDL - colesterol usado na síntese dos esteróides advém de depósitos intracelulares, esta transferência é mediada por várias proteínas carreadoras que são responsivas ao estímulo do AMPc. Além disto, a presença de receptores de FSH nas células granulosas do folículo ovariano e de LH nas células da teca determinam o sistema de duas células para explicar os eventos que precedem o crescimento folicular e, portanto, a esteroidogênese (Kase *et al*, 1995).

O LDL sofre, então, conversão para pregnenolona que se constitui a matriz da 17-hidroxiprogesterona e da progesterona. Há 02 vias para a esteroidogênese: via delta 4, com participação de 17 – hidroxiprogesterona, no corpo lúteo, e via delta 5 predominantemente no folículo (Bulun *et al*, 2001).

Sob a mediação da 17- α hidroxilase, na via delta 5, a pregnenolona converte-se em 17-hidroxipregnenolona e a partir da enzima desmolase ocorre sua passagem para deidroepiandrosterona. Com a ação das enzimas 3- β -ol-desidrogenase e delta-4-isomerase a deidroepiandrosterona converte-se em androstenediona (Zeitoun, Bulun, 1999; Bulun *et al*, 2001).

Na via delta 4, através da ação enzimática da 3- β -ol-desidrogenase há conversão da pregnenolona em progesterona; esta por sua vez passa a 17-

hidroxiprogesterona sob mediação da 17- α -hidroxilase. Age, então, a desmolase formando androstenediona (Kase *et al*, 1995).

A aromatase é a responsável pela conversão da androstenediona em estrona e da testosterona em estradiol (Kase *et al*, 1995).

No ovário humano as células da granulosa do folículo pré ovulatório sintetizam grandes quantidades de estrógeno, primariamente o 17 β estradiol, em resposta a estimulação do hormônio folículo estimulante (FSH). O FSH liga-se a receptores de superfície na célula causando elevação do AMPc intracelular que por sua vez estimula a expressão da aromatase P450. Logo após a ovulação os níveis de estrógeno sofrem declínio transitório, mas voltam a aumentar durante a fase luteal pela indução do RNA mensageiro da P450 aromatase (Michael *et al*, 1995).

A ligação do FSH com receptores na membrana das células da granulosa ovariana, aumentando os níveis intracelulares de AMPc, deflagra a transcrição de 2 fatores, que são: o fator esteroideogênico 1 e a proteína que se liga ao AMPc (CREB), ambos ligam-se ao promotor 2 do gene de codificação da aromatase. A CREB, então, ativa a expressão da aromatase e, conseqüentemente, a produção de estrógeno (Michael *et al*, 1995; Michael, 1997).

1.2 - Aromatase

Citocromo P450 é o termo genérico utilizado para designar uma família de enzimas que tem a terminologia 450 em sua nomenclatura. As enzimas P450 podem metabolizar uma série de substratos. Distintas enzimas P450 são identificadas no processo de esteroidogênese: P450scc faz a clivagem do colesterol; P450c11 mediando a 11-hidroxilase e a 18-hidroxilase; P450c17 mediando a 17-hidroxilase; P450c21 mediando a 21-hidroxilase; e a P450arom intermediando a aromatização de androgênios em estrogênios (Adashi *et al*, 1996) (Tab.1).

TABELA 1: Diferentes enzimas da família P450, sua localização celular e reação na esteroidogênese.

<i>Enzima</i>	<i>Localização celular</i>	<i>Reação</i>
P450scc	Mitocôndria	Cliva cadeia do colesterol
P450c11	Mitocôndria	11-hidroxilase e 18- hidroxilase
P450c17	Retículo Endoplasmático	17-hidroxilase
P450c21	Retículo Endoplasmático	21-hidroxilase
P450arom	Retículo Endoplasmático	Aromatase

A formação de estrógeno (estrona e estradiol) a partir de esteróides da C19 é catalisada por uma específica fração da P450 chamada de aromatase P450, um produto de gene CYP 19. O gene CYP 19 humano localizado no cromossomo 15q21.2 é formado por 123 kilobases (kb) e compreende 9 éxons codificadores (éxons II - X) que são comuns a outras isoformas da

citocromo P450 (Michael *et al*, 1995).

A aromatase compreende duas proteínas: P450arom e NADPH-citocromo P450 redutase. A P450 aromatase cataliza uma série de reações que formam o anel fenólico A, que caracteriza os estrogênios; a NADPH-citocromo P450 redutase é uma flavoproteína presente na maioria das células responsável pela redução da NADPH para a forma microsomal da citocromo P450 (Adashi *et al*, 1996).

A expressão da aromatase em várias células humanas é regulada pelo uso de promotores no sincício trofoblasto placentário (promotor I.1), granulosa ovariana e células testiculares de Leydig (promotor II), fibroblastos do tecido adiposo (promotores I.4, I.3 e II) e fibroblastos de pele (promotor II) (Kitawaki *et al*, 1999b). A atividade da aromatase e o nível de transcrição da P450 aromatase nestas células podem ser estimulados por análogos do AMPc. Membros da família da citoquina IL-6 na presença de glucocorticóides podem induzir a expressão da aromatase em fibroblastos do tecido adiposo (Kitawaki *et al*, 1999a).

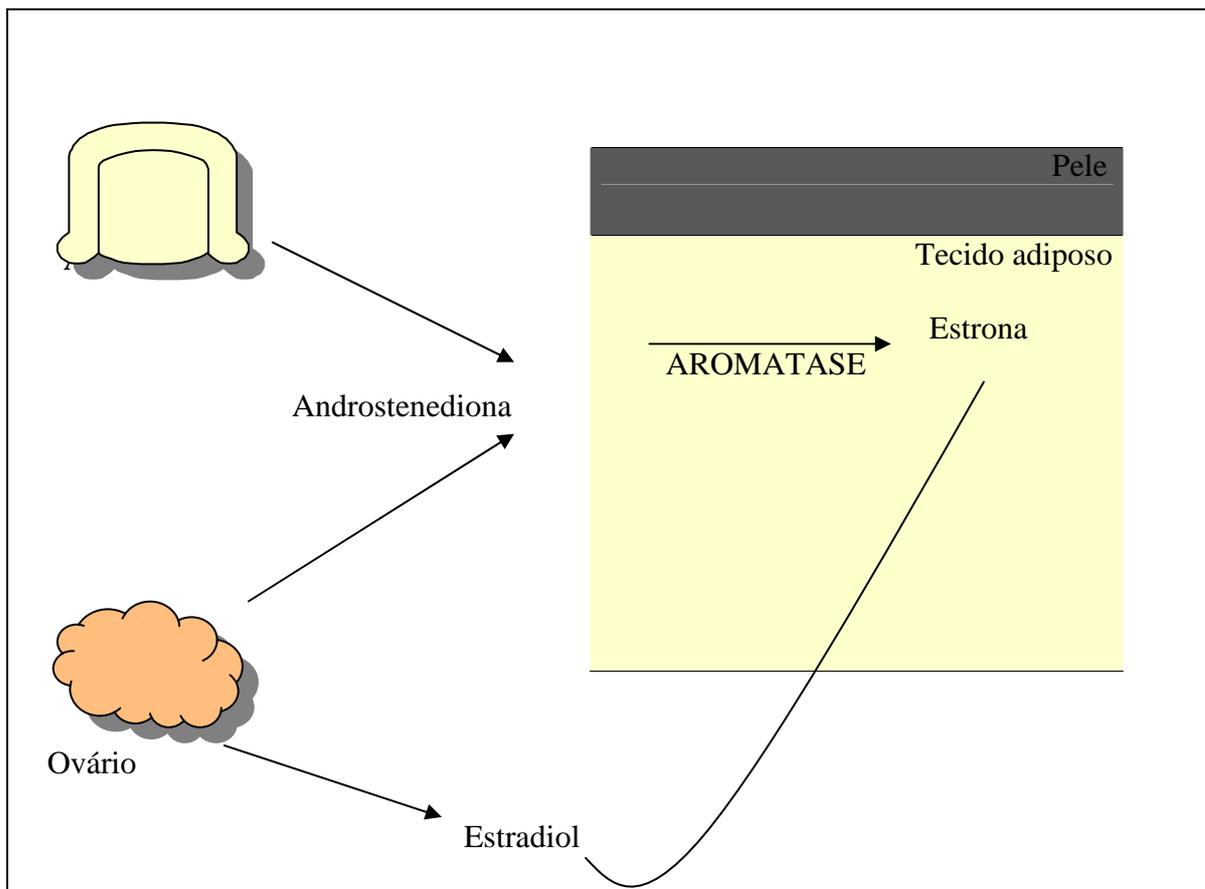
A aromatase não é expressa em fragmentos de miométrio ou de endométrio de mulheres livres de doença, entretanto demonstra-se que em câncer endometrial e leiomiomas uterinos há expressão da aromatase. Isto sugere que há um papel estrogênico na regulação do crescimento destas neoplasias. Previamente mostrou-se a presença de transcriptores da P450 em implantes endometrióticos pélvicos e fragmentos endometriais eutópicos de pacientes com endometriose enquanto no endométrio de mulheres livres de

doença ou em suas biópsias peritoneais não se encontrou aromatase (Kitawaki *et al*, 1999a).

1.3 - Aromatase e endometriose

O estrogênio parece exercer um importante papel no estabelecimento e na manutenção da endometriose (Noble *et al*, 1997).

Nas mulheres em idade reprodutiva a biossíntese de estrógenos ocorre no ovário, enquanto após a menopausa, a produção estrogênica advém principalmente da conversão periférica de andrógenos, pela ação da aromatase, em tecidos extraglandulares como a pele e o tecido adiposo, este último reconhecidamente e, ao contrário do ovário, não é mediado por AMPc e sim por citocinas como as interleucinas 6 a 11, o fator de necrose tumoral e glicocorticóides utilizando neste caso o promotor 1 do gene CYP 19 (MacDonald *et al*, 1967; 1978; Ackerman *et al*, 1981; Casey, Mac Donald, 1983). Nesta situação, o principal substrato da aromatase é a androstenediona, de origem primariamente adrenal. Inicialmente a conversão dá-se para estrona e a seguir para estradiol perifericamente (Moretão *et al*, 2001) (Fig.01).



(adaptado de Zeitoun, Bulun, 1999)

FIGURA 1- Síntese de estrógeno extraovariano.

A aromatização extragonadal e extrahepática da androstenediona circulante parece ser o principal mecanismo de formação estrogênica nas mulheres na pós a menopausa. A fração de conversão no plasma de androstenediona em estrona (E1), esta aumentada com a obesidade, idade e doenças hepáticas. Esta fração de conversão mostra uma relação positiva com peso corporal excessivo em ambas as mulheres, na pré e após a menopausa, e pode aumentar em cerca de 10 vezes a morbidade de mulheres obesas climatéricas (Ackerman *et al*, 1981).

A maior porção da atividade de aromatase em tecido adiposo humano

reside no estroma celular mais que nos adipócitos. Estes achados sugerem que a atividade da aromatase presente em ambos os fragmentos tissulares não é menor quando se separam células estromais/vasculares de adipócitos. Por esta razão a produção de estrógeno em tecido adiposo humano ocorrer mais nas células estromais que nos adipócitos. Esta observação é muito importante porque um aumento na formação estrogênica extraglandular com a obesidade pode resultar em um aumento no número de células estromais no tecido adiposo de tais pessoas. Mais do que isso, o número de células estromais do tecido adiposo aparentemente não diminui com a perda de peso corporal. Uma explicação seria que a fração de conversão no plasma de androstenedioma em estrona em indivíduos obesos não diminuiria com a perda de peso (Ackerman *et al*, 1981).

Estudos demonstram expressão e aumento da atividade da aromatase em implantes peritoneais e ovarianos de endometriose, bem como no endométrio tópico de mulheres com endometriose moderada e grave (Yamamoto *et al*, 1993; Kitawaki *et al*, 1999b; Yang *et al*, 2002b; Kyama *et al*, 2008), demonstrando um aumento na concentração local do estrogênio nestes tecidos, enquanto em mulheres sem doença ginecológica – endometriose, adenomiose e miomatose - o endométrio não tem níveis detectáveis de aromatase P450, justificando uma provável produção local para sustentar a permanência do foco de endometriose (Kitawaki *et al*, 1999a).

Da mesma forma polimorfismos gênicos de CYP 19 e de CYP 17 - genes para codificação da aromatase - foram encontrados em altos níveis em implantes de mulheres com endometriose e endometriomas, sugerindo que

este efeito dos metabólitos de estrogênio e sua produção *in loco* possam explicar a permanência de endometriose em mulheres climatéricas (Takayama *et al*, 1998; Kado *et al*, 2002).

Uma resposta inflamatória endometrial exacerbada pode ser a chave para o desenvolvimento da endometriose, podendo inclusive estimular sua progressão (Leyendecker *et al*, 1998). Destarte, a prostaglandina E2 (PGE2), encontrada no estroma de endometriose, considerada o principal indutor da transcrição da aromatase e de sua atividade estimuladora, exercida através do promotor II do gene da aromatase (CYP 19) (Noble *et al*, 1997). Além disso, o próprio estrógeno aumenta a produção de PGE2 através de um estímulo exercido sobre a ciclooxigenase do tipo 2 (COX2). Deste modo, esta retroalimentação positiva cria um ciclo vicioso, com contínua produção local de PGE2 e estrógeno, favorecendo as características inflamatórias e intensa atividade celular da endometriose (Bulun *et al*, 2001).

Foram observadas também taxas de recorrência de dor pélvica de até 75% em 5 anos, em pacientes submetidas a tratamento clínico exclusivo com análogos do GnRH. Tal fato pode ser explicado pela produção extraglandular de estradiol e pela retomada da esteroidogênese ovariana após o término do tratamento (Takayama *et al*, 1998). Um dos fatores que mais evidenciam a importância da produção periférica de estrógeno é a recorrência de dor pélvica e endometriose em mulheres submetidas à histerectomia com salpingooforectomia bilateral e em mulheres após a menopausa (Metzger *et al*, 1991; Bulun *et al*, 2002,). A literatura tenta explicar de várias formas a recorrência destes sintomas, uma das possibilidades seria a síndrome do

ovário residual, em que a excisão incompleta de tecido ovariano cortical, particularmente na dor pélvica crônica e na endometriose, poderia manter a produção estrogênica, não havendo, portanto supressão do FSH. Outra possibilidade seria o surgimento de adenocarcinoma derivado de endometriose após o ato cirúrgico e cortes histológicos seriados poderiam revelar este diagnóstico. Também se cogita a possibilidade de implantes de células endometrióticas no momento cirúrgico que a posteriori seriam estimuladas pela terapêutica hormonal (Vignali *et al*, 2002; Somigliana *et al*, 2003).

Em 1998, o uso bem sucedido de uma droga inibidora de aromatase, no tratamento de mulher de 57 anos, com endometriose grave recorrente em cúpula vaginal, foi o primeiro relato de sucesso desta terapêutica para eliminação da dor e dos focos remanescentes de endometriose não responsiva a outras terapias, sugerindo que o bloqueio local da atividade da aromatase possa bloquear a produção local de estradiol (Takayama *et al*, 1998).

Considerando a gravidade da forma infiltrativa de manifestação da doença e vislumbrando eventuais aplicações terapêuticas das drogas inibidoras da aromatase, buscaremos neste estudo quantificar a atividade de aromatase avaliando sua expressão nos diferentes tipos de lesão endometriótica.

2. OBJETIVOS

No presente estudo tivemos como objetivos:

1. Avaliar a expressão da proteína aromatase P450 através da técnica de imunistoquímica em espécimes cirúrgicos de mulheres portadoras de endometriose pélvica profunda.

2. Comparar a expressão da proteína P450 com a localização das biópsias e o grau de diferenciação histológica, em espécimes cirúrgicos de mulheres portadoras de endometriose profunda.

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1 - Casuística

Este estudo foi realizado no setor de Endoscopia Ginecológica e Endometriose do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia (DOGI) da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, com aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa (Anexo 1), no período de fevereiro de 2004 a fevereiro de 2006.

Avaliamos 96 biópsias extraídas de 14 mulheres que foram submetidas ao tratamento cirúrgico laparoscópico da endometriose. A idade destas mulheres variou de 26 a 52 anos, com média de 37,1 anos e desvio padrão de 7,1 anos (range=26).

Todas estas mulheres apresentavam indicação formal para realização de cirurgia laparoscópica para investigação e tratamento de endometriose e foram operadas de fevereiro de 2004 a fevereiro de 2006. As mesmas foram submetidas à investigação clínica e a exames complementares de rotina em nosso serviço. Esta investigação incluiu exames laboratoriais pré-operatórios, inclusive marcadores de seguimento do tratamento e recidiva como o CA-125, ultrassonografia abdominal pélvica e endovaginal, ressonância de pelve e ecocolonosopia; a seguir as pacientes foram submetidas à cirurgia

laparoscópica durante a qual avaliamos a extensão da moléstia (estadiamento segundo a *American Society for Reproductive Medicine*, 1996), a localização das lesões (peritônio superficial, ovários, ligamentos útero-sacrais e reto-sigmóide) e a possibilidade de tratamento cirúrgico laparoscópico no mesmo ato. Foram realizadas ainda, biópsias das lesões superficiais e dos focos profundos, tendo como objetivo a análise histológica e a verificação da presença e da expressão da aromatase P450 nestes fragmentos.

3.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

Inclusão:

Mulheres, selecionadas e atendidas no Ambulatório de Endometriose da Clínica de Endoscopia Ginecológica do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Santa Casa de São Paulo, que preenchiam os requisitos de quadro clínico, laboratorial e radiológico sugestivo de endometriose profunda, que não tinham realizado tratamento cirúrgico ou clínico prévios nos últimos seis meses, com idade variando de 20 a 52 anos e apresentando ciclos eumenorrêicos.

Exclusão:

Todas aquelas que não seguiam os critérios acima, ou que eram portadoras de doenças infecto-contagiosas, doenças crônicas, inclusive doenças imunológicas, que estavam em período de menopausa ou no período climatério/senil propriamente dito e em uso contínuo de medicamentos.

3.2 - Método

3.2.1 Avaliação histopatológica

Os espécimes cirúrgicos foram fixados em solução de formaldeído tamponado a 10% e processados segundo o Serviço de Anatomia Patológica da ICMSCSP. Os fragmentos foram desidratados em álcool etílico, clareados pelo xilol e embebidos em parafina, para confecção dos blocos. Os blocos foram cortados por meio de micrótomo calibrado para cortes de 4µm de espessura. Os cortes histológicos foram corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE), e realizada a leitura em microscópio óptico comum em campos de 200 e 400 aumentos.

3.2.2 TMA

Os blocos de parafina selecionados foram encaminhados para a Divisão de Anatomia Patológica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), onde foi aplicada a técnica do TMA - *tissue microarray* (Kamat *et al*, 2004).

A padronização e aplicação da técnica de Arranjos Teciduais em Matriz (TMA) seguiram as especificações do fabricante e avaliação pormenorizada dos relatos da literatura, segundo as etapas abaixo discriminadas:

a) Separação dos blocos e lâminas originais pertinentes às casuísticas de interesse com obtenção de nova secção histológica corada pela

Hematoxilina-eosina (HE).

b) Revisão histopatológica das lâminas e seleção de áreas de interesse ao estudo imunoistoquímico.

c) Marcação da área selecionada no respectivo bloco de parafina.

d) Utilização do aparelho para criar espaço vasado (“casela”) no bloco receptor.

e) Extração, do bloco doador, de um cilindro tecidual de 1mm de diâmetro da respectiva área de interesse previamente selecionada.

f) Transferência do cilindro tecidual obtido do bloco doador para a “casela” previamente criada no bloco receptor.

g) Progressão, em frações de milímetros, a novas posições dentro do bloco receptor, de modo a criar coletânea de amostras teciduais seguindo disposição matricial.

h) Avaliação da qualidade do bloco final para armazenamento.

A seguir demonstramos a planilha utilizada para demarcar cada fragmento de tecido inserido no bloco de parafina por meio da técnica de TMA (Fig. 2).

		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	mm	0	1,8	3,6	5,4	7,2	9	10,8	12,6	14,4	16,2	18
0	0	Liver Core										
1	1,8											
2	3,6											
3	5,4											
4	7,2											
5	9											
6	10,8											
7	12,6											
8	14,4											
9	16,2											
10	18											
11	19,8											
	mm	0	1,8	3,6	5,4	7,2	9	10,8	12,6	14,4	16,2	18

FIGURA 02 - Planilha da lâmina com “caselas” para locação do TMA.

Na figura 3 observa-se o bloco em parafina contendo todos os fragmentos estudados.

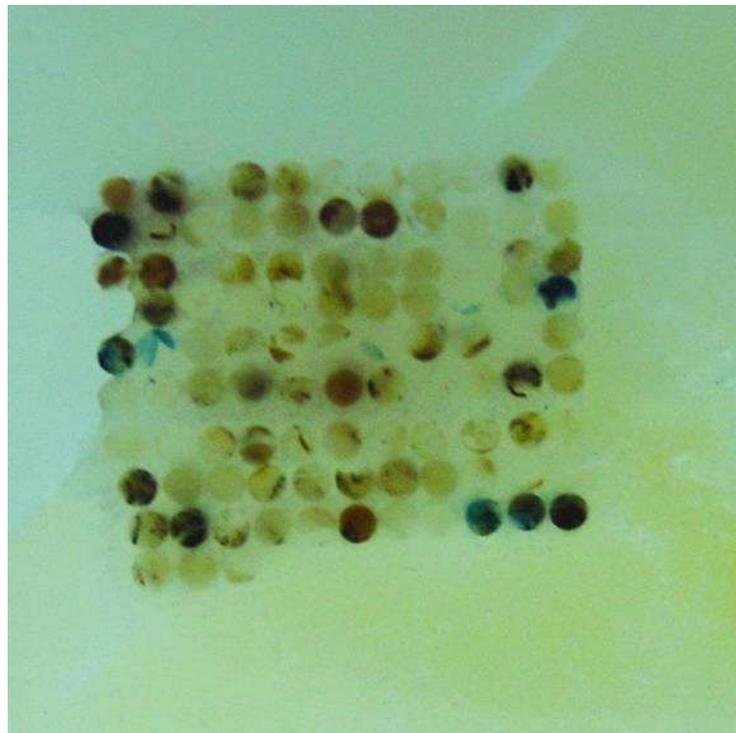


FIGURA 3 - Bloco em parafina com 100 casos de endometriose obtidos pela técnica do TMA.

Durante a etapa de revisão histológica das lâminas confirmou-se a presença de endometriose em todos os casos.

3.2.3 Estudo imunoistoquímico

O método utilizado para identificação da proteína aromatase P450 foi o da streptavidina-biotina-peroxidase e para a análise da expressão da enzima aromatase utilizaram-se anticorpos policlonais anti-aromatase, obtidos a partir do soro de camundongos (MCA2077, *Serotec Inc.*).

Seguiu-se o protocolo de reações de Boenisch T. de 2001 (Anexo 02).

3.2.4 Critérios de avaliação da expressão de aromatase

A avaliação da expressão da aromatase foi realizada de forma cega por 02 examinadores (SHMSR e MALGS) e aferição foi realizada sempre no mesmo campo óptico, com aumento de 200 vezes.

Baseados nos critérios previamente descritos por Ristimäki *et al*, em 2002, criamos e aplicamos, neste estudo um novo escore da imunoexpressão da aromatase P450 (Tab. 2).

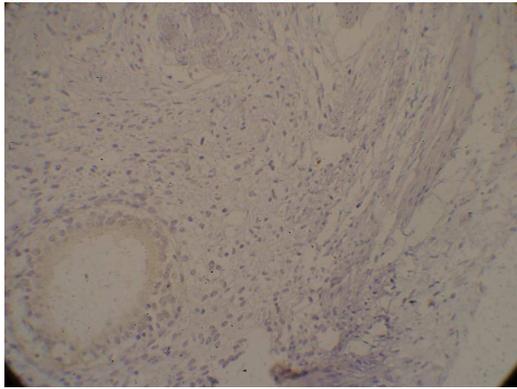
TABELA 2 - Escore utilizado para avaliar a imunexpressão da aromatase P450arom em espécimes cirúrgicos de mulheres portadoras de endometriose profunda

<i>Escore</i>	<i>Critérios avaliados para determinar o escore</i>
Escore 0	Não se observam células coradas
Escore 1	Citoplasma e membrana celular corados fracamente (deve apresentar pelo menos 10% das células coradas com intensidade fraca)
Escore 2	Coloração citoplasmática granular e da membrana celular moderada em 10-30% das células
Escore 3	Mais de 30% das células coradas com intensidade forte

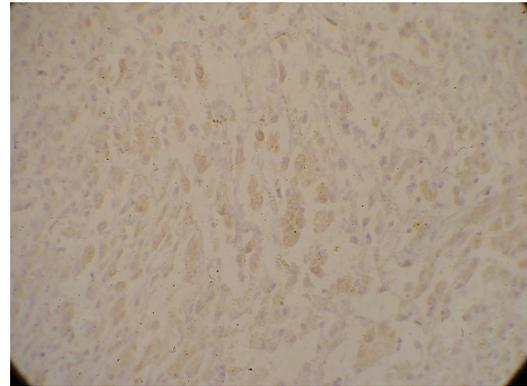
Desta forma, a expressão foi classificada em positiva ou negativa e as amostras com escores de zero ou negativas, um, dois ou três (positivas). As células positivas foram identificadas pela coloração marrom sépia.

Em todos os fragmentos com escore zero procedeu-se a contra-prova e estes cortes foram incubados novamente com o anticorpo primário policlonal P450arom, em solução 1/50, e em 100% deles confirmou-se o escore negativo.

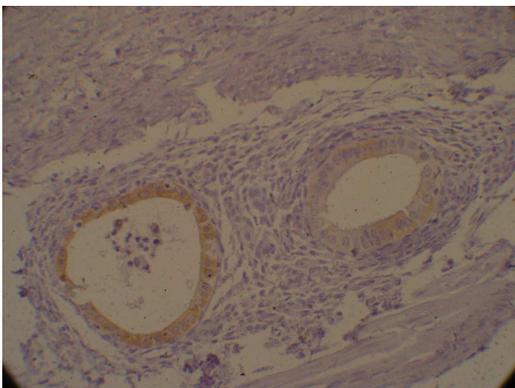
Nas figuras a seguir, exemplificamos a classificação da expressão da aromatase P450 segundo os escores avaliados pela técnica da imunohistoquímica (Detalhes em Anexo 3, figuras 4 a 11).



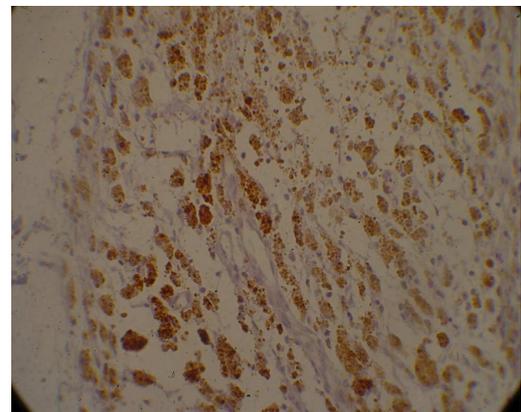
Escore 0



Escore +1



Escore +2



Escore +3

3.3 - Análise estatística

Os dados das pacientes estudadas foram analisados empregando-se os softwares Excel para Windows 2003 e SPSS para Windows versão 11. Para análise estatística das frequências estudadas utilizamos o teste de Chi-quadrado, e o teste exato de Fischer quando indicado. As diferenças foram consideradas significantes quando a probabilidade de igualdade era menor que 5 % ($p < 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1- Dados epidemiológicos

Analizamos 96 biópsias removidas de diferentes localizações, a saber: peritônio, ligamentos útero-sacrais, ovários e segmentos intestinais de reto e sigmóide. Todos estes fragmentos foram avaliados histologicamente sob microscopia ótica com confirmação de endometriose segundo os critérios da ESHRE (Tab. 3)(Kennedy *et al*, 2005).

TABELA 3 – Distribuição da localização das biópsias em mulheres submetidas ao tratamento cirúrgico laparoscópico da endometriose superficial e profunda no período de Fev/2004 a Fev/2006 no Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Santa Casa de São Paulo.

<i>Localização da Biópsia</i>	<i>Frequência N</i>	<i>Porcentagem (%)</i>
Peritônio	16	16,7
Ligamento Útero-sacro	34	35,4
Reto e Sigmóide	33	34,4
Ovário	13	13,5
Total	96	100

Do total dos fragmentos estudados a avaliação do grau histológico da endometriose evidenciou padrão estromal em 17 biópsias (17,7%), padrão glandular bem diferenciado em 27 biópsias (28,1%), endometriose com padrão

glandular misto em 24 casos (25%) e em 28 fragmentos (29,2%) observou-se o padrão glandular pouco diferenciado (Tab. 4).

TABELA 4 – Distribuição do grau histológico da endometriose em biópsias de mulheres submetidas ao tratamento cirúrgico laparoscópico da endometriose superficial e profunda no período de Fev/2004 a Fev/2006 no Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Santa Casa de São Paulo

<i>Grau Histológico</i>	<i>Frequência</i>		<i>Porcentagem</i>	
	<i>N</i>		<i>(%)</i>	
Estromal	17		17,7	
Glandular bem diferenciada	27		28,1	
Glandular mista	24		25,0	
Glandular pouco diferenciada	28		29,2	
Total	96		100	

A análise estatística não evidenciou diferenças no grau histológico da endometriose entre os fragmentos com imunoexpressão para aromatase P450 positiva e negativa (Tab.5).

TABELA 5: Avaliação da associação do grau histológico da endometriose e da imunoexpressão da aromatase P450 em biópsias de mulheres submetidas ao tratamento cirúrgico laparoscópico da endometriose superficial e profunda no período de Fev/2004 a Fev/ 2006 no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Santa Casa de São Paulo

<i>Grau Histológico</i>	<i>Imunoexpressão da P450arom</i>	
	<i>Negativa (%)</i>	<i>Positiva n (%)</i>
Estromal	07 (13,0)*	10 (23,8)
Glandular bem diferenciada	16 (29,6)*	11 (26,2)
Glandular mista	16 (29,6)*	8 (19,0)
Glandular pouco diferenciada	15 (27,8)*	13 (31)
Total	54 (100)	42 (100)

*Teste do Qui-quadrado e Teste exato de Fisher = não significante (p>0.05)

A imunexpressão da aromatase P450 nos 96 fragmentos estudados foi negativa em 54 biópsias (56,2%) e positiva em 42 biópsias (43,8%). Analisando os dados segundo o escore previamente descrito em nossa metodologia observou-se que, dos casos positivos, 31 (32,3%) correspondiam ao escore +1, 8 (8,3%) ao escore +2 e em 3 biópsias (3,1%) observou-se o escore positivo +3 (Tab. 6).

TABELA 6 – Distribuição do escore da imunexpressão da aromatase P450 em biópsias de mulheres submetidas ao tratamento cirúrgico laparoscópico da endometriose superficial e profunda no período de Fev/2004 a Fev/2006 no Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Santa Casa de São Paulo

<i>Escore</i>	<i>Frequência</i> <i>N</i>	<i>Porcentagem</i> <i>(%)</i>
0 (negativo)	54	56,2
+1 (positivo)	31	32,3
+2 (positivo)	08	8,3
+3 (positivo)	03	3,1
Total	96	100

A expressão da aromatase P450 foi avaliada em fragmentos obtidos de 04 diferentes localizações: peritônio, ligamentos útero-sacrais, reto-sigmóide e ovário. A imunexpressão da aromatase P450 nos fragmentos de peritônio foi positiva em 10 casos, correspondendo a 10,4% do total de 96 fragmentos estudados. Nos ligamentos útero-sacrais observou-se imunexpressão positiva em 14 casos (14,6%) e nos fragmentos de reto-sigmóide em 11 casos (11,5%). Já nos fragmentos de ovário observou-se positividade da imunexpressão da aromatase P450 em 7 casos, correspondendo a 7,3% do total de fragmentos

estudados. A análise estatística por meio do teste do qui-quadrado não demonstrou diferença na imunopressão da aromatase P450 nas diferentes localizações estudadas (Tab. 7).

TABELA 7 – Análise percentual da imunopressão da aromatase P450 e da localização das biópsias de mulheres submetidas ao tratamento cirúrgico laparoscópico da endometriose superficial e profunda no período de Fev/2004 a Fev/2006 no Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Santa Casa de São Paulo

<i>Localização das Biópsias</i>	<i>Imunopressão da P450_{arom}</i>		<i>Positivos/Total (%)</i>
	<i>Negativa</i>	<i>Positiva</i>	
	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>	
Peritônio	6 (11,1)	10 (23,8)*	10,4%
Ligamento Útero-sacro	20 (37,1)	14 (33,3)*	14,6%
Reto-sigmóide	22 (40,7)	11 (26,2)*	11,5%
Ovário	6 (11,1)	7 (16,7)*	7,3%
Total	54 (100)	42 (100)	43,8%

*Teste do Qui-quadrado e Teste exato de Fisher = não significante (p>0.05)

Avaliando-se a imunopressão da aromatase P450 de acordo com o escore previamente descrito e comparando-a com a localização das biópsias observou-se maior frequência do escore 0 (negativo) nos fragmentos obtidos do reto-sigmóide (40,7%) quando comparados aos escores +1, +2, +3 (p=0.04). Nos fragmentos obtidos do peritônio, dos ligamentos útero-sacrais e dos ovários não se observou diferença na proporção de resultados negativos ou positivos segundo o escore imunohistoquímico (Tab. 8).

TABELA 8 – Análise do escore da imunexpressão da aromatase P450 e da localização das biópsias de mulheres submetidas ao tratamento cirúrgico laparoscópico da endometriose superficial e profunda no período de Fev/2004 a Fev/2006 no Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Santa Casa de São Paulo

<i>Localização das Biópsias</i>	<i>Imunoistoquímica</i>				<i>Negativos Total (%)</i>
	<i>ESCORE</i>				
	<i>0 n (%)</i>	<i>+1 n (%)</i>	<i>+2 n (%)</i>	<i>+3 n (%)</i>	
Peritônio	6 (11,1)	7 (22,6)	3 (37,5)	0 (0)	6,3%
Ligamento Útero-sacro	20 (37,1)	14 (45,2)	0 (0)	0 (0)	20,8%
Reto-sigmóide	22 (40,7)*	7 (22,6)	1 (12,5)	3 (100)	22,9%
Ovário	6 (11,1)	3 (9,7)	4 (50,0)	0 (0)	6,3%
Total	54 (100)	31 (100)	8 (100)	3 (100)	56,3%

*Teste Exato de Fisher = significante (p=0.04)

5. DISCUSSÃO

O estudo da endometriose compreende atualmente mais de um século de intensas pesquisas e publicações a respeito. As pesquisas, clínica e laboratorial representaram a base para a detecção de marcadores bioquímicos que pudessem aprimorar o diagnóstico e o tratamento das mulheres portadoras de endometriose (Sampson *et al*, 1927; Noble *et al*, 1996).

Várias terapias medicamentosas têm sido utilizadas concomitantemente ao tratamento cirúrgico da endometriose (Santen, 2002; Garcia-Velasco, Quea, 2005; Attar, Bulun, 2006; Mousa *et al*, 2007). Dentre estas os análogos de GnRH representam o grupo de drogas utilizado com maior frequência. Apesar do intenso hipoestrogenismo vivenciado pelas usuárias destas medicações nem sempre a regressão da moléstia é observada. Assim, a procura por tratamentos que possam agir localmente nas lesões, ao invés de bloquear a função ovariana, tem sido alvo de inúmeras pesquisas. Busca-se então, encontrar aplicações clínicas precisas que para drogas que atuem localmente nas lesões de endometriose.

Estes fatos são a base para o nosso estudo da imunoexpressão da aromatase P450 em espécimes cirúrgicos de mulheres portadoras de endometriose pélvica profunda e para estudos futuros do uso de inibidores de

aromatase em mulheres portadoras de doença recidivante (Bulun *et al*, 1993; Yano *et al*, 1996; Zeitoun, Bulun, 1999; Vignali *et al*, 2002).

Recentemente em 2007, Remorgida *et al* avaliaram a associação de letrozole 2,5mg (Femara®) com desogestrel 75mcg (Cerazette®), associados a carbonato de cálcio 1000mg e vitamina D 880UI/ dia para 12 mulheres com estágio IV de endometriose refratária a outros tratamentos cirúrgicos e medicamentosos. O estudo foi interrompido sem que nenhuma mulher concluísse o seguimento clínico, pois houve desenvolvimento de cistos ovarianos bilaterais, em média após 84 dias de tratamento e aumento da dismenorréia e da dispareunia durante o tratamento.

O primeiro relato da literatura acerca da expressão da aromatase P450 em implantes endometrióticos foi o estudo de Noble *et al*, em 1996. Neste estudo os autores coletaram, durante laparotomia ou videolaparoscopia realizadas em de 21 mulheres, 17 fragmentos de implantes peritoneais de endometriose, 11 fragmentos de endométrio proveniente de curetagem uterina de mulheres com endometriose, 7 biópsias de peritônio normal de mulheres com a moléstia e 07 fragmentos de endométrio de mulheres que se submeteram a histerectomia por prolapso uterino, miomatose ou doenças cervicais. Os autores encontraram, empregando a técnica do PCR, transcrição da P450 aromatase em todos os 17 implantes peritoneais de endometriose e em todas as 11 biópsias endometriais de pacientes portadoras da doença. Já nos fragmentos coletados de mulheres sadias (peritônio e endométrio), não houve detecção da aromatase P450.

Parece-nos que a aromatase e, possivelmente a produção local de estrógeno no endométrio destas mulheres, possa contribuir para a capacidade de implantação das células endometriais na superfície peritoneal. Ressalta-se ainda que por se tratar de moléstia com características marcadamente inflamatórias, esta produção local de estrogênios, associada à ação de macrófagos e interleucinas, poderia estimular o crescimento e manutenção da doença (Garcia- Velasco *et al*, 1999).

Outros estudos demonstraram também que a aromatase P450, enzima que catalisa a conversão dos esteróides da C19 em estrona, poderia ser expressa em endométrio tópico de mulheres portadoras de endometriose, mas não no endométrio de mulheres livres de doença (Noble *et al*, 1997; Kitawaki *et al*, 1999b).

Em nosso estudo diferentemente de alguns relatos da literatura que analisaram o endométrio tópico, optamos por estudar exclusivamente o tecido endometriótico dividindo-o de acordo com sua localização e profundidade. A idéia de estudar o tecido comprometido e não somente o endométrio das mulheres portadoras de endometriose baseou-se na escassez de estudo com este desenho e acima de tudo, no quadro clínico exuberante destas mulheres portadoras de endometriose profunda. Além do mais, empregamos pioneiramente em estudos de endometriose profunda a utilização do TMA para obtenção do fragmento que foi submetido à análise imunoistoquímica, não havendo relatos de igual teor na literatura avaliada até então.

Dheenadayalu *et al*, em 2002 avaliou em seu estudo 56 biópsias

endometriais de mulheres submetidas a videolaparoscopia para detecção de endometriose e encontrou em 67% dos casos (37 biópsias) positividade para a aromatase P450. Este autor não empregou nenhum tipo de escore e a positividade ocorreu de forma independente da classificação da AFS, que é baseada nas seqüelas e conseqüências da doença. Em nosso estudo, analisando os fragmentos de tecido com endometriose encontramos positividade de 43,8% para aromatase P450 nos fragmentos estudados. A análise estatística não demonstrou diferença na positividade de acordo com a localização ou profundidade das lesões. Assim, os fragmentos de peritônio, de ligamento útero-sacro, de reto e sigmóide e de ovário, expressam igualmente a enzima aromatase P450 quando testados binária, simplesmente analisando-se os resultados em positivo ou negativo.

Acien *et al*, em 2007, avaliou a expressão da aromatase em fragmentos de tecido endometriótico em 62 mulheres com diagnóstico de endometriose e 12 mulheres livres da doença submetidas à cirurgia. Os fragmentos foram analisados por imunistoquímica e encontrou-se 61,3% de positividade para expressão da aromatase nas mulheres portadoras de endometriose. Nas pacientes sem doença a imunoexpressão foi negativa. Nas mulheres com imunoexpressão positiva encontrou-se maior número de endometriomas, com mais bilateralidade, e dor pélvica de moderada a grave, além de infertilidade e miomatose mais freqüente nestas mulheres. Acredita-se que alterações moleculares que determinem a presença da aromatase podem estar associadas ao desenvolvimento e manutenção da endometriose, bem como maior gravidade dos casos.

Yamamoto *et al*, em 1993 já havia estudado o miométrio uterino de nove mulheres submetidas a histerectomia por dismenorréia intratável e com prole constituída. Todas tiveram diagnóstico macroscópico de adenomiose. Analisou-se a atividade de aromatase no tecido miometrial incluindo-se o endométrio correspondente por técnica de imunoistoquímica. Quando se comparou a atividade de aromatase e as fases proliferativa ou secretora nos fragmentos estudados não houve diferenças significantes e o uso de danazol suprimiu a atividade da aromatase em 17 a 50%. Uma marcação positiva para aromatase foi detectada no citoplasma das células glandulares do endométrio das mulheres com adenomiose, da mesma forma nos componentes glandulares do tecido adenomiótico; entretanto não houve percepção bioquímica de atividade enzimática nas células estromais, tanto endometriais quanto adenomióticas. Estes resultados demonstram que há atividade de aromatase na adenomiose e marcadamente em células glandulares. Em nosso estudo não observamos associação entre o grau de diferenciação histológica e a imunoexpressão da aromatase P450 nos fragmentos estudados (Abrão *et al*, 2003; Kamergorodsky *et al*, 2007).

Kitawaki *et al* (1999b) estudou 105 biópsias de endométrio de mulheres submetidas a laparotomia para histerectomia ou videolaparoscopia para diagnóstico de endometriose e através da análise imunoistoquímica detectou que endometriose, miomatose e adenomiose podem ter alta acurácia em sua detecção pelas biópsias endometriais, podendo-se usar o método com alta sensibilidade (91%) e especificidade (100%) para rastreamento da doença. Em todos os seus casos de positividade encontrou grande variação no

escore dos espécimes obtidos e sem relação do escore com a classificação da ESHRE. Em mulheres que não apresentavam nenhuma destas moléstias ginecológicas, adenomiose, endometriose e/ou miomatose, não encontrou expressão de aromatase, nem de seu RNAm. Assim, parece-nos evidente que apesar da possível utilização da imunexpressão da aromatase P450 como método diagnóstico em biópsias de endométrio de mulheres sintomáticas, ainda carecemos de um preciso diagnóstico diferencial com outras afecções estrogênio-dependentes.

Yang *et al* (2002a) estudou a regulação da transcrição do gene da P450 aromatase em dois tipos celulares: células de parede de endometrioma ovariano e fragmentos de endométrio típico de mulheres que se submeteram à cirurgia videolaparoscópica para ressecção destes endometriomas e de mulheres que se submeteram à histerectomia por neoplasia intraepitelial cervical. Encontrou que em células estromais endometrióticas há níveis muito mais altos de RNA m de aromatase P450 e que por outro lado as células estromais de endométrio típico não expressam níveis suficientes de RNA m para que se detecte a atividade enzimática. Comparativamente com nosso estudo encontramos uma ampla variação na expressão da enzima aromatase P450, sendo que nos fragmentos ovarianos observamos positividade em 07 fragmentos, correspondendo a 53,8% do total de ovários estudados. Ressaltamos ainda que 50% dos ovários estudados apresentavam escore +2, ou seja, 10 a 30% de células coradas na avaliação de sua imunexpressão. Empregando o mesmo escore imunistoquímico observamos que 40,7% das biópsias de reto e sigmóide testaram negativas e, 26,6% apresentavam escore

1+, 12,5 % escore 2+ e em 3 casos observamos escore 3+. A subdivisão dos casos positivos de acordo com este escore gerou um resultado estatisticamente significativo ($p=0.04$). Assim, parece-nos verdadeiro que estudos em amostras maiores possam confirmar a mesma tendência nos fragmentos de ligamento útero-sacro.

Maia *et al*, em 2008, avaliou por imunistoquímica os efeitos do gestodeno na expressão da aromatase no endométrio de mulheres portadoras de endometriose, utilizando-se da comparação de dois grupos, com e sem medicação. Encontrou 92% de imunexpressão positiva em mulheres não tratadas e apenas 6% em usuárias deste anticoncepcional.

Células estromais de endometriose incubadas com análogo de AMPc mostram níveis muito altos de atividade de aromatase quando comparadas com siciotrofoblasto placentário. Da mesma forma a atividade da aromatase é estimulada pela prostaglandina E2 que por sua vez tem seu aumento de formação à custa do estrogênio que estimula a ciclooxygenase 2 (Simpson *et al*, 2002). O questionamento consiste em quais diferenças moleculares possam estimular a indução da expressão da aromatase na endometriose e inibição no endométrio uterino tópico. Parece que uma alteração molecular no gene que expressa a aromatase na endometriose possa levar a este aumento de produção nas células estromais.

Não obstante este complexo mecanismo genético e biomolecular que determina a expressão da aromatase P450 em nosso estudo, a imunexpressão desta enzima foi baixa. Poderíamos explicar esta baixa positividade então,

voltando à compreensão de que é necessário haver primeiro a mutação gênica para depois observarmos a imunoexpressão de um determinado fator. Assim, parece-nos ser que entre a elevada imunoexpressão da aromatase P450 no endométrio das mulheres portadoras de endometriose, e a baixa positividade da imunoexpressão nos fragmentos de tecido aqui estudados, deve existir algum fator dificultante.

Em 2006, Heilier *et al* , realizando PCR para expressão da aromatase (CYP 19) e ovário, peritônio e nódulos de endometriose profunda, encontrou expressão ovariana oito vezes maior, o que pode sugerir que os inibidores da aromatase possam agir de forma mais intensa nesta forma da doença.

A indução cirúrgica de endometriose em um modelo experimental com ratos, feita por Fang *et al*, em 2002 mostrou que é necessária a presença simultânea do gene intacto da P450 aromatase com a atividade enzimática da própria aromatase para efetuar o crescimento dos tecidos uterinos ectópicos nestas cobaias de modelos experimentais.

Assim, parece-nos evidente que os mecanismos responsáveis pela expressão da aromatase P450 na doença endometriótica são similares, mas não necessariamente iguais, aos observados no endométrio destas mesmas mulheres.

6. CONCLUSÕES

1. A expressão da proteína aromatase P450 avaliada através da técnica de imunohistoquímica em espécimes cirúrgicos de mulheres portadoras de endometriose pélvica profunda apresenta baixa positividade.

2. Não observamos diferenças na imunexpressão da aromatase P450 nos locais estudados.

3. Não houve associação entre o grau de diferenciação histológica e a imunexpressão da aromatase P450.

7. ANEXOS

Anexo 1

Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da ISCMSP



IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
 APROVADO PELA CONEP/MS EM 30/04/97-REF: CNS/CARTA 32 DOC.
 Rua Dr. Cesário Mota Júnior, 112 Santa Cecília CEP 01277900 São Paulo -SP
 PABX (11) 32240122 Ramal: 5502 – Fax- Ramal: 5710 E-mail: eticamed@santacasasp.org.br

São Paulo, 28 de junho de 2004.

Projeto nº 071/04
 Informe este número para identificar
 seu projeto no CEP

Ilmo.(a).Sr.(a).

Dr.(a).Sílvia Helena Magalhães Stockler Riachi
 Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

O Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMSP, reunido no dia **28/04/2004** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa **“Expressão da aromatase p450 no endométrio, nas lesões peritoneais superficiais, e nos focos profundos, em mulheres portadoras de endometriose pélvica”**, emitiu parecer inicial em pendência e nesta data enquadrando-o na seguinte categoria:

- Aprovado inclusive o TCLE ;**
- Com pendência** modificações ou informação relevante a serem atendidas em 60 dias (enviar as alterações em duas cópias)
- Retirado**, por não ser reapresentado no prazo determinado;
- Não aprovado:** e
- Aprovado** inclusive o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS -CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias. **Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.**

Prof. Dr. Daniel R. Muñoz
 Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
 ISCMSP

Anexo 2

Reação Imunoistoquímica – Protocolo de Boenisch

1. Cortes histológicos dos tecidos, com 3µm de espessura. Montagem dos cortes em lâminas sinalizadas, com retirada da parafina em estufa a 55° C, e manutenção dos mesmos em temperatura ambiente.
2. Desparafização dos cortes com xilol a 60° C, durante 30 minutos, seguida por mais dois banhos em xilol à temperatura ambiente, durando quinze minutos cada.
3. Reidratação dos cortes com etanol absoluto (etanol absoluto I, etanol absoluto II, etanol absoluto III, etanol 95° GL e etanol 80° GL [GayLussac]), cada banho durando dois minutos, seguida por lavagem em água corrente e finalizada em passagem por água destilada.
4. Adição de 1.600 ml do tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0) aos cortes, com exposição ao vapor durante 30 minutos, com a finalidade de recuperação do epítipo antigênico, com a finalidade de restituir antigenicidade á proteína afetada pela fixação dos tecidos em formalina. Manutenção das lâminas em vapor, por 30 minutos. Após a retirada das lâminas, conservação das mesmas em solução tamponada, á temperatura ambiente, durante 20 minutos.
5. Reação de inibição da peroxidase endógena, através de lavagem das lâminas em peróxido de hidrogênio a 3% , por quatro vezes, por dez minutos cada, e lavagem em água parada, por cinco minutos.
6. Lavagem das lâminas no tampão salino PBS (pH 7.4), por duas vezes por 15 minutos.
7. Incubação das lâminas com o anticorpo primário citado anteriormente, na diluição especificada pelo fabricante (aromatase: 1:50), em geladeira, por 18 horas.

8. Lavagem das lâminas, por duas vezes, em tampão PBS (pH: 7,4), por dez minutos.
9. Incubação dos cortes teciduais com anticorpos secundários (anticorpos de ligação), por 30 minutos em estufa a 37°C. No estudo foi utilizado anticorpo secundário biotilado universal [Kit DAKO LSAB Systems Peroxidase (DakoCorp., Carpinteria, CA, USA)].
10. Lavagem das lâminas em tampão PBS, duas vezes, por dez minutos.
11. Incubação das lâminas em anticorpo terciário, estreptavidina-biotina-peroxidase (Kit DAKO LSAB Systems, Peroxidase-universal), em câmara úmida, por 30 minutos, em estufa a 37°C.
12. Lavagem das lâminas em solução tampão, duas vezes, por dez minutos.
13. Colocação das lâminas para reação cromógena em 3,3',5,5' tetrahidrocloroto de diaminobenzidina (DAB), por três a cinco minutos, ocorrendo a reação que resulta no aparecimento da cor sépia, característica do anticorpo fixado à proteína.
14. Lavagem em água corrente, duas vezes, por dez minutos
15. Contra-coloração rotineira com hematoxilina de Mayer, por três minutos, em temperatura ambiente, para obtenção de coloração azulada do citoplasma e do núcleo.
16. Desidratação dos cortes com série de etanol (50-70-100°. GL) e xilol.
17. Montagem das lâminas através de sua fixação sobre Entellan Marck, a fim de que a preparação passe a ter conservação permanente.

Anexo 3 – Figuras 4 a 11

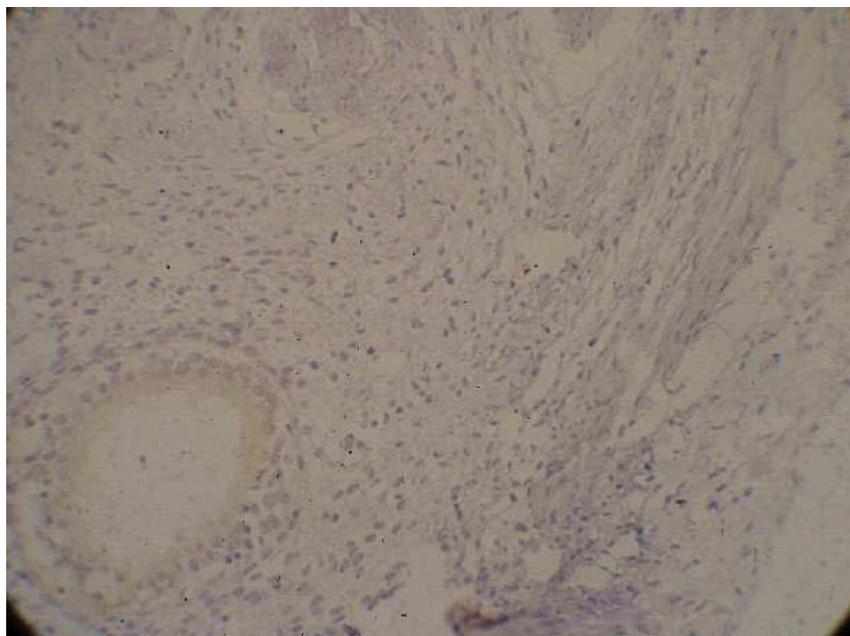


FIGURA 4 – Corte histológico de fragmento de ligamento útero sacro com endometriose de padrão glandular mista e imunoposição da aromatase P450 escore 0 (IH, 400x)

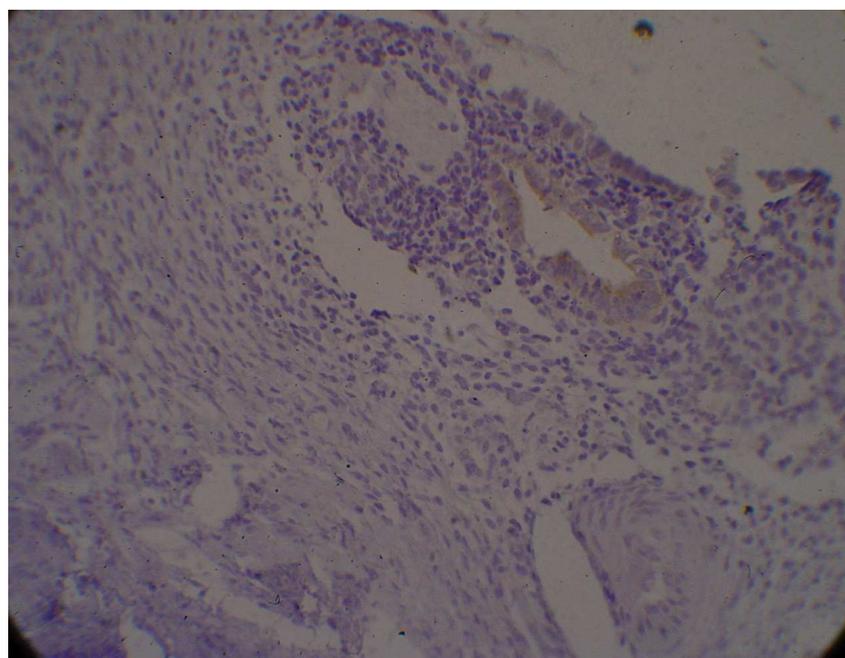


FIGURA 5 – Corte histológico de fragmento de reto-sigmóide com endometriose de padrão glandular bem diferenciado e imunoposição da aromatase P450 escore +1 (IH, 400x)

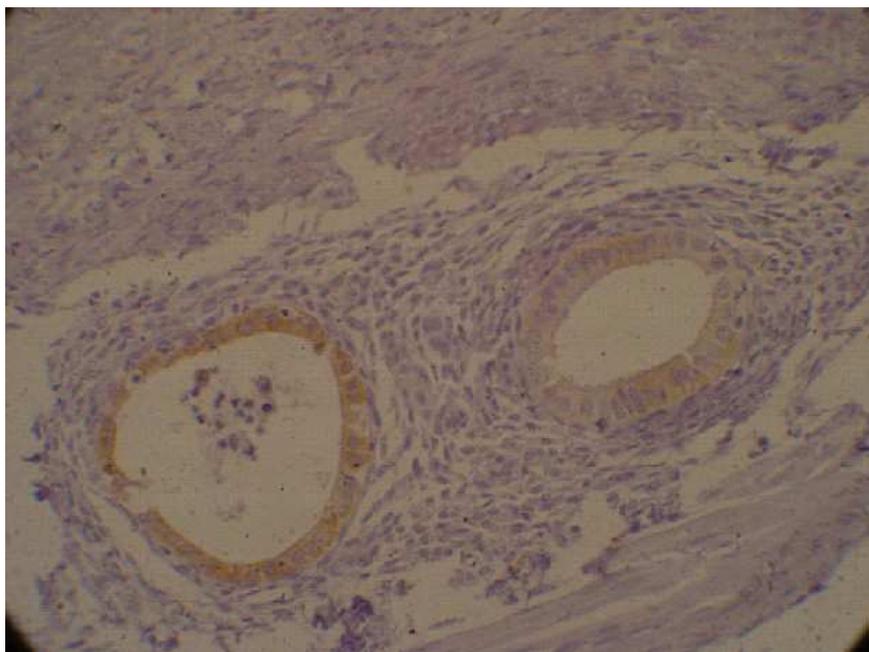


FIGURA 6 – Corte histológico de fragmento de reto-sigmóide com endometriose de padrão glandular bem diferenciado e imunoposição da aromatase P450 escore +2 (IH, 400x)

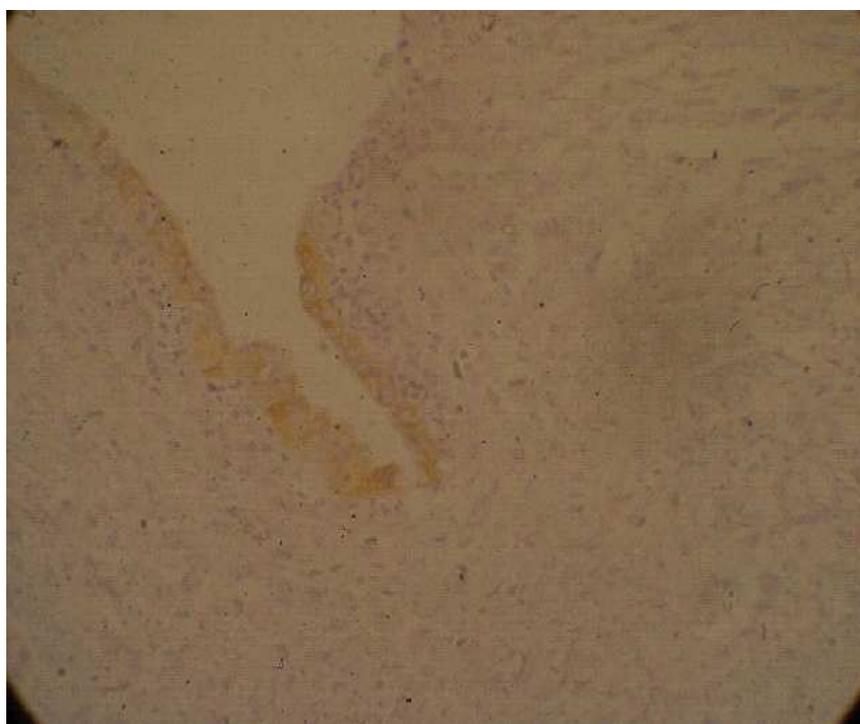


FIGURA 7 – Corte histológico de fragmento de reto-sigmóide com endometriose de padrão glandular bem diferenciado e imunoposição da aromatase P450 escore +2 (IH, 400x)

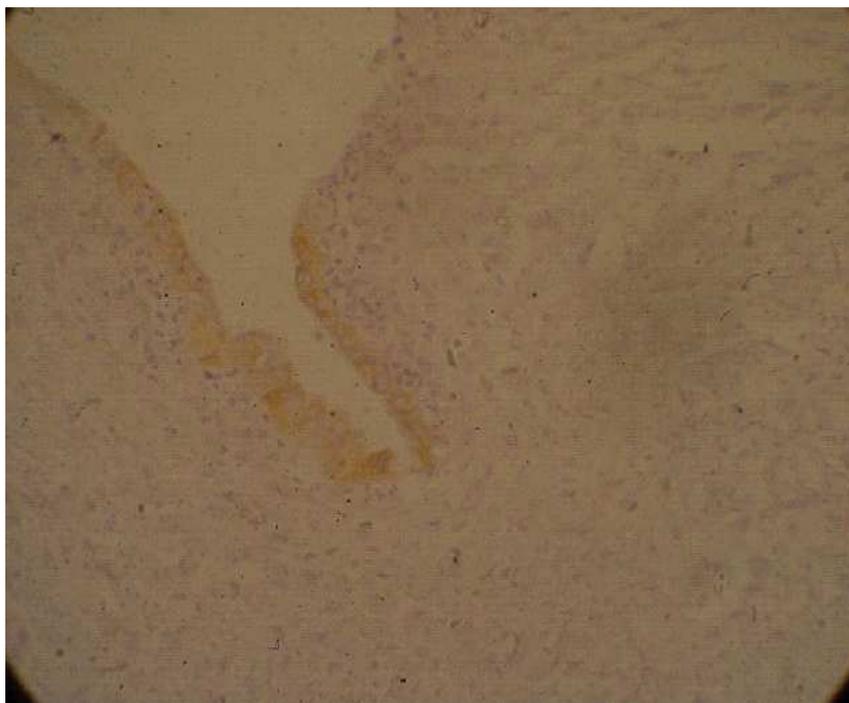


FIGURA 8 – Corte histológico de fragmento de reto-sigmóide com endometriose de padrão estromal e imunoreação da aromatase P450 escore +2 (IH, 400x)

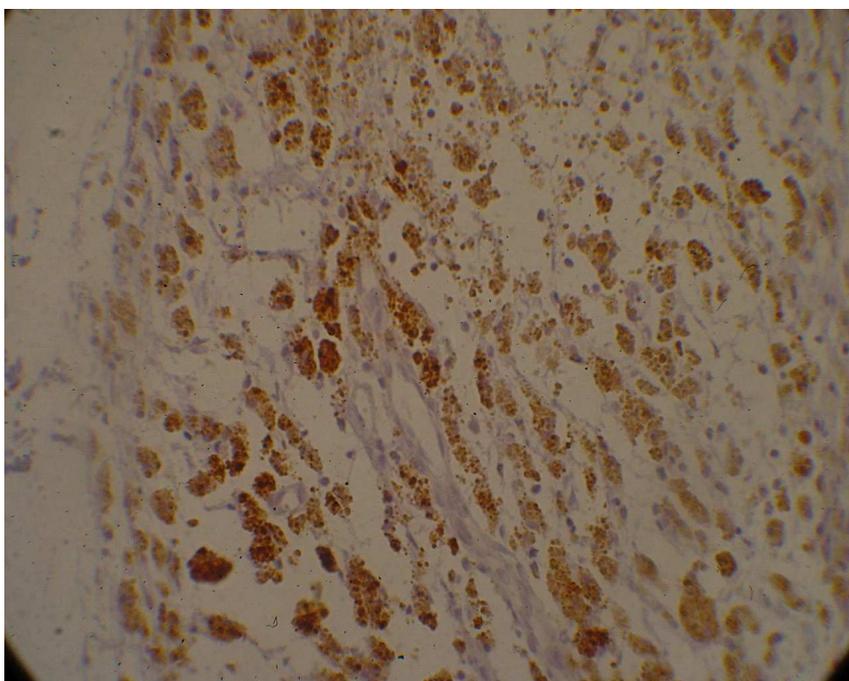


FIGURA 9 – Corte histológico de fragmento de peritônio com endometriose de padrão estromal e imunoreação da aromatase P450 escore +3 (IH, 400x)

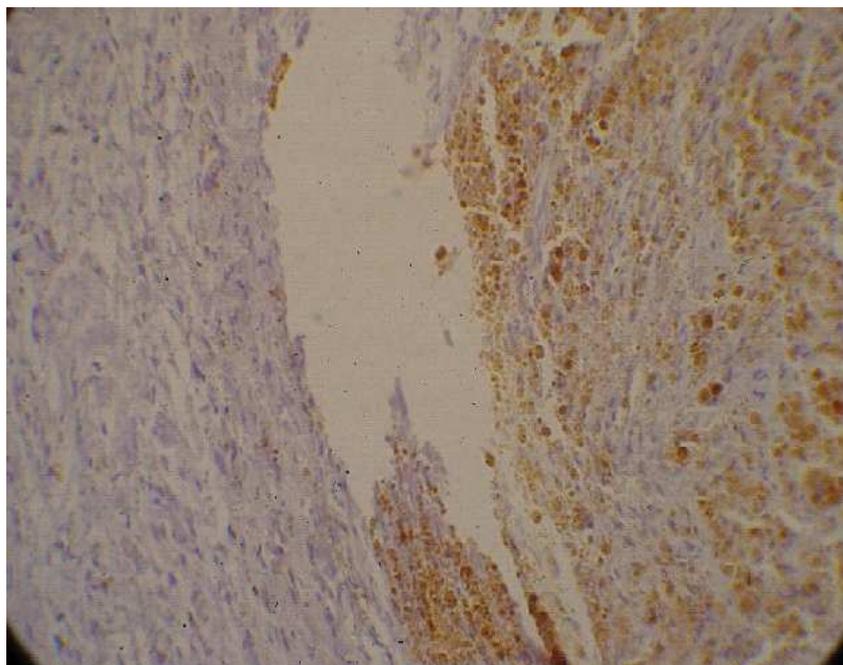


FIGURA 10 – Corte histológico de fragmento de ovário com endometriose de padrão glandular indiferenciado e imunoexpressão da aromatase P450 escore +3 (IH, 400x)

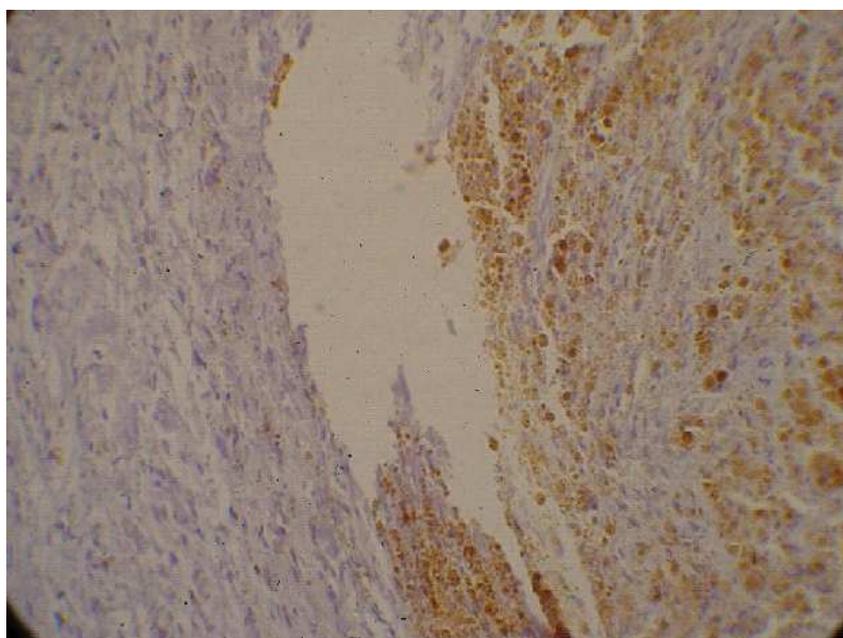


FIGURA 11 – Corte histológico de ovário com endometriose de padrão glandular indiferenciado e imunoexpressão da aromatase P450 escore +3 (IH, 400x).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Abrão MS, Gonçalves MO, Dias Jr JA, Podgac S, Chamie LP, Blasbalg R. Comparison between clinical examination, transvaginal sonography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of deep endometriosis. *Hum Reprod.* 2007;22:3092-7.

Acien P. Endometriosis and Genital Anomalies: some histogenic aspects of external endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 1986;22:102-7.

Acién P, Velasco I, Gutiérrez M, Martínez-Beltrán M. Aromatase expression in endometriotic tissues and its relationship to clinical and analytical findings. *Fertil Steril.* 2007 ;88:32-8

Ackerman GE, Smith ME, Mendelson CR, Mac Donald PC, Simpson ER. Aromatization of Androstenedione by Human Adipose Tissue Stromal Cells in Monolayer Culture. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981;53:412-17.

Adashi EY, Rock JA, Rozenwaks Z. *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology.* Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia; 1996

Attar E, Bulun SE. Aromatase inhibitors: the next generation of therapeutics for endometriosis? *Fertil Steril.* 2006;85:1307-18.

Badaway SZA, Cuenca V, Stiizel A, Jacobs RBD, Tomar RH. Autoimmune phenomena in fertile patients with endometriosis. *Obstet Gynecol.* 1984;63:271-75..

Barbosa CP. Frequência de endometriose em mulheres assintomáticas e sua relação com o marcador Ca-125 II no soro e o OC-125 no peritônio; também em material de biópsias de endometriose de pacientes sintomáticas. Tese (Doutorado). São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1999.

Bazot M, Malzy P, Cortez A, Roseau G, Amouyal P, Darai E. Accuracy of transvaginal sonography and rectal endoscopic sonography in the diagnosis of deep infiltrating endometriosis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007;30:994-1001.

Beliard A, Donnez J, Nisolle M, Foidart J-M. Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin, and integrins in endometrium and endometriosis. *Fertil Steril*. 1997;67:266-72.

Boenisch T. Handbook: Immunochemical staining methods. 3 ed. Carpinteria: Dakocytomation Corporation 2001.p 64.

Braun DP, Dmowsky WP. Endometriosis: abnormal endometrium and dysfunctional immune response. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1998;10:365-9.

Bulun SE, Price TM, Aitken J, Mahendroo MS, Simpson E. A Link Between Breast Cancer and Local Estrogen Biosynthesis Suggested by Quantification of Breast Adipose Tissue Aromatase Cytochrome P 450. Transcripts Using Polymerase Chain Reaction After Reverse Transcription. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;77:1633-28.

Bulun SE, Simpson ER, Word A. Expression of the CYP19 gene and Its Product Aromatase P 450 in Human Leiomyoma Tissues and Cells in Culture. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;78:736-43.

Bulun SE, Yang S, Fang Z, Gurates B, Tamura M, Sebastian S. Estrogen Production and Metabolism in Endometriosis. *Ann New York Acad Sci*. 2002;955:75-85.discussion 86-8, 396-406.

Bulun SE, Yang S, Fang Z, Gurates B, Tamura M, Zhou J *et al*. Role of Aromatase in Endometrial Disease. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001;79:19-25.

Casey ML, Mac Donald PC. Origin of Estrogen and the Regulation of Estrogen Formation in Postmenopausal Women. *Menopause*. 1983:1-8.

Chatman DL. Pelvic peritoneal defects and endometriosis: Allen-Masters syndrome revisited. *Fertil Steril*. 1981;36:751-6.

Cornillie FJ, Oosterlink D, Lauweryns JM, Koninckx PR. Deeply Infiltrating Pelvic Endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril*. 1990;53:978-83.

D'Amora P, Sato H, Girão MJ, Silva ID, Schor E. Polymorphisms in exons 1B and 1C of the type I interleukin-1 receptor gene in patients with endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2006;56:178-84.

De Carvalho CV, Nogueira de Souza NC, Costa AM *et al*. Genetic polymorphisms of cytochrome P450c17alpha (VYP17) and progesterone receptor genes (PROGINS) in the assessment of endometriosis risk. *Gynecol Endocrinol*. 2007;23:29-33.

De Placido G, Alviggi C, Di Palma G, Caravetta C, Matarese G, Landino G, *et al.* Serum concentrations of soluble human leukocyte class I antigens and of the soluble intercellular adhesion molecule-I in endometriosis: relationship with stage and non-pigmented peritoneal lesions. *Hum Reprod.* 1998;13:3206-10.

Dheenadayalu K, Mak I, Gordts S, Campo R, Higham J, Puttemans P *et al.* Aromatase p 450 Messenger RNA Expression in Eutopic Endometrium is not a Specific Marker for Pelvic Endometriosis. *Fertil Steril.* 2002;78:825-29.

Doty DW, Gruber JS, Wolf GC. 46XY, pure Gonadal Dysgenesis: report of 2 unusual cases. *Obstet Gynecol.* 1980;55(3 suppl):61s-65s.

Dumontier I, Roseau G, Vincent B, Chapron C, Dousset B, Chaussade S *et al.* Apport comparé de l'échoendoscopie et de l'imagerie par résonance magnétique dans le bilan de l'endometriose pelvienne profonde. *Gastroenterol Clin Biol.* 2000;24:1197-204.

El-Mahgoub S, Yaseen S. A Positive Proof for the Theory of Coelomic Metaplasia. *Am J Obstet Gynecol.* 1980;137:137-40.

Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin N Am.* 1997;24:235-8.

Fang Z, Yang S, Gurates B, Tamura M, Simpson E, Evans D *et al.* Genetic or Enzymatic Disruption of Aromatase Inhibits the Growth of Ectopic Uterine Tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:3460-66.

Garcia-Velasco JA, Arici A, Zreik T, Naftolin F, Mor G. Macrophage derived growth factors modulates fas ligand expression in cultures endometrial stromal cells: a role in endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 1999;5:642-50.

Garcia-Velasco JA, Quea G. Medical treatment of endometriosis. *Minerva Ginecol.* 2005; 57:249-55.

Heilier JF, Donnez O, Van Kerckhove V, Lison D, Donnez J Expression of aromatase (P450 aromatase/CYP19) in peritoneal and ovarian endometriotic tissues and deep endometriotic (adenomyotic) nodules of the rectovaginal septum. *Fertil Steril.* 2006;85:1516-8

Hompes PG, Mijatovic V. Endometriosis: the way forward. *Gynecol Endocrinol.* 2007;23:5-12.

Izzo VM, Zecchi de Souza A, Mattos AB, Santos NC, Maluf M, Perin PM *et al.* Importância da laparoscopia em ginecologia: análise de 522 casos. *Gin Obstet Bras.* 1984;7:325-35.

Jansen RPS, Russel P. Non-pigmented endometriosis: clinical laparoscopic and pathologic definition. *Am J Obstet Gynecol.* 1986;155:1154-9.

Kado N, Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, Koshiha H, Kusuki I *et al.* Association of the CYP17 gene and CYP19 gene with risk of endometriosis. *Hum Reprod.* 2002;17:897-902.

Kamat AA, Younes OS, Sayeeduddin M, Wheller TM, Simpson JL, AgoulNIK AI. Protein expression profiling of endometriosis: validation of 2-mm tissue microarrays. *Fertil Steril.* 2004;82:1681-3.

Kamergorodsky G, Ribeiro PAAG, Silva MALG, Abrão MS, Lemos NB, Donadio N *et al.* Avaliação da classificação histológica da endometriose em mulheres portadoras de endometriose pélvica superficial e profunda. *RBGO* 2007;29:568-74.

Kase NG, Speroff L, Glass RH. *Endocrinologia Ginecológica Clínica e Infertilidade.* 5ª ed. São Paulo: Editora Manole; 1995.

Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, *et al.* ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod.* 2005;20:2698-704.

Kitawaki J, Kusuki I, Koshiha H, Tsukamoto K, Fushiki S, Honjo H. Detection of aromatase cytochrome P-450 in endometrial biopsy specimens as a diagnostic test for endometriosis. *Fertil Steril.* 1999a;72:1100-6.

Kitawaki J, Kusuki I, Koshiha H, Tsukamoto K, Honjo H. Expression of Aromatase P 450 in Eutopic Endometrium and Its Application as a Diagnostic Test for Endometriosis. *Gynecol Obstet Invest.* 1999b;48(Suppl 1):21-8.

Kitawaki J, Noguchi T, Amatsu T, Maeda K, Tsukamoto K, Yamamoto T *et al.* Expression of Aromatase Cytochrome P 450 Protein and Messenger Ribonucleic Acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biol Reprod.* 1997;57:514-19.

Koninckx PR, Barlow D, Kennedy S. Implantation versus Infiltration: the Sampson versus the endometriotic disease theory. *Obstet Gynecol Invest.* 1999;47(Suppl):3-10.

Koninckx PR, Martin DC. Deep Endometriosis: a consequence of infiltration or retraction or possibly adenomyosis externa? *Fertil Steril.* 1992;58:924-28.

Koninckx PR, Oosterlynck D, D'Hooghe T, Meuleman C. Deeply Infiltrating Endometriosis Is a Disease Whereas Mild Endometriosis Could Be Considered a Non-Disease. *Ann N York Acad Sci.* 1994;734:333-41.

Kyama CM, Overbergh L, Mihalyi A, Meuleman C, Mwenda JM, Mathieu C, D'Hooghe TM. Endometrial and peritoneal expression of aromatase, cytokines, and adhesion factors in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2008;89:301-10

Leyendecker G, Kunz G, Noe M, Mall G. Endometriosis: a dysfunction and disease of archimetra. *Hum Reprod Update*. 1998;4:752-62.

MacDonald PC, Edman CD, Hemsell DL, Porter JC, Siiteri PK. Effect of Obesity on Conversion of Plasma Androstenedione to Estrone in Postmenopausal Women with and without Endometrial Cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 1978;130:448-55.

MacDonald PC, Rombaut RP, Siiteri PK. Plasma Precursors of Estrogen. I. Extent of Conversion of Plasma Δ^4 -Androstenedione to Estrone in Normal Males and Non-pregnant Normal, Castrate, and Adrenalectomized Females. *J Clin Endocrinol Metab*. 1967;27:1103-11.

Mahmood TA, Templeton AA, Thomson L, Frase C. Menstrual symptoms in women with pelvic endometriosis. *Br J Obstet Gynaecol*. 1991;98:558-63.

Maia H Jr, Casoy J, Correia T, Freitas LA, Pimentel K, Athayde C. The effect of oral contraceptives on aromatase expression in the eutopic endometrium of patients with endometriosis. *Gynecol Endocrinol*. 2008.24:123-8.

Martin B, Dana A, Levy L, Owczarczak W, Teman G. Imagerie par résonance magnétique et endométrie pelvienne. In: Belaisch J, Audebert A, Bronsens IA, Canis M, Leroy JL, Tran DK. *L'endométrie*. Paris: Masson; 1999. p.134-44.

Merrill JA. Endometrial Induction of Endometriosis Across Millipore Filters. *Am J Obstet Gynecol*. 1966;94:780-90.

Metzger DA, Lessey BA, Soper JT, McCarty KS Haney AF. Hormone-resistant endometriosis following total abdominal hysterectomy and bilateral salpingo-oophorectomy. *Obstet Gynecol*. 1991;78(5 Pt 2):946-50.

Meyer R. The current question of adenomyositis and adenomyomas in general and particular seroepithelial adenomyositis and sarcomatoid adenomyometritis. *Zentralbl Gynakol*. 1919;43:745-50.

Michael MD . A CRE-like sequence that binds CREB and contributes to cAMP-dependent regulation of the proximal promoter of the human aromatase p 450(CYP19) gene. *Mol Cell Endocrinol*. 1997;134:147-56.

- Michael MD, Kingore MW, Morohashi K, Simpson ER. Ad4BP/SF-1 regulates cyclic AMP-induced transcription from the proximal promoter (PII) of the human aromatase P 450(CYP19) gene in the ovary. *J Biol Chem*. 1995; 270:13561-6.
- Moretão AL, Angulski C, Piazza MJ. Inibidores da aromatase e seu uso na prática clínica. *Femina*. 2001;29:695-700.
- Mousa NA, Bedaiwy MA, Casper RF. Aromatase inhibitors in the treatment of severe endometriosis. *Obstet Gynecol*. 2007;109:1421-3
- Muscato JJ, Haney AF, Weinberg JB. Sperm phagocytosis by human peritoneal macrophages: A possible cause of infertility in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1982;144:503-10.
- Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril*. 1997;68:585-95.
- Noble LS, Simpson ER, Johns E, Bulun SE. Aromatase Expression in Endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:174-79.
- Noble LS, Takayama K, Zeitoun KM, Putman JM, Johns DA, Hinshelwood MM, *et al*. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82: 600-6.
- Nothnick WB, D'Hooghe TM. Medical Management of Endometriosis: Novel Targets and Approaches Towards the Development of Future Treatment Regimes. *Gynecol Obstet Invest*. 2003;55:189-98.
- Olive DL, Schwartz LB. Endometriosis. *N Engl J Med*. 1993;328:1759-68.
- Osteen KG, Bruner KL, Eisenberg E. The disease endometriosis. In: Diamond MP, Osteen KG. *Endometrium & Endometriosis*. Blackwell Science;1997. p.20-6.
- Oosterlynck DJ, Cornillie,FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx . Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril*. 1991;56:45-51.
- Perry CP, Mena MV. Occult retrocervical endometriosis. A case report. *J Reprod Med*. 1995;40:652-4.
- Remorgida V, Abbamonte LH, Ragni N, Fulcheri E, Ferrero S. Letrozole and desogestrel-only contraceptive pill for the treatment of stage IV endometriosis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2007;47:222-5

Ribeiro PAAG, Rossini L, Almeida-Prado RA, Aoki T, Donadio N, Ferreira TA *et al.* The Echo-logic for deep pelvic endometriosis. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 2002;9(3):S74.

Ribeiro HS, Ribeiro PAAG, Rossini L, Rodrigues FC, Donadio N, Aoki T. Double-contrast barium enema and transrectal endoscopic ultrasonography in the diagnosis of intestinal deeply infiltrating endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol.* 2008;15:315-20.

Ristimäki A, Sivula A, Lundin J. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res.* 2002;62:632-35.

Sampson JA, Albany NY. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 1927;14:422-69.

Santen RJ. Clinical review 149: To Block Estrogen's Synthesis or Action: that's the question. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:3007-12.

Schor E, da Silva ID, Sato H, Baracat EC, Girão MJ, de Freitas V. P27(Kip1) is down-regulated in the endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2008 (in press).

Semino C, Semino A, Pietra G, Mingari MC, Barocci S, Venturini PL, *et al.* Role of major histocompatibility complex class I expression and natural killer-like T-cells in the genetic control of endometriosis. *Fertil Steril.* 1995; 64:909-16.

Simpson ER, Clyne C, Speed C, Rubin G, Bulun S. Tissue – Specific Estrogen Biosynthesis and Metabolism. *Ann New York Acad Sci.* 2002:58-67.

Somigliana E, Chiodini A, Odorizzi MP, Pompei F, Viganò P. La Terapia dell'endometriosi. *Minerva Ginecol.* 2003;55:15-23.

Somigliana E, Viganò P, Vignali M. Endometriosis and unexplained recurrent spontaneous abortion: pathological states resulting from aberrant modulation of natural killer cell function? *Hum Reprod Update.* 1999;5:41-52.

Steele RW, Dmowski WP, Marmar DJ. Immunologic aspects of human endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 1984;6:33.

Sumitani H, Shozu M, Segawa T, Murakami K, Yang HJ, Shimada K *et al.* *In Situ* Estrogen Synthesized by Aromatase p 450 in Uterine Leiomyoma Cells Promotes Cell Growth Probably Via an Autocrine/Intracrine Mechanism. *Endocr Soc.* 2000;141:3852-61.

Sutton CJG, Ewen SP, Whitelow N, Haines P. Prospective, randomized, double-blind, controlled trial of laser laparoscopy in the treatment of pelvic pain associated with minimal, mild, and moderate endometriosis. *Fertil Steril.* 1994;62:696-700.

Takayama K, Zeitoun K, Gunbi RT, Sasano H, Carr BR, Bulun SE. Treatment of Severe Postmenopausal Endometriosis With an Aromatase Inhibitor. *Fertil Steril.* 1998;69:709-13.

Umariá N, Olliff J. Imaging features of pelvic endometriosis. *Br J Radiol.* 2001;78:556-62.

Viganò P, Gaffuri B, Somigliana E, Busacca M, Di Blasio AM, Vignali M. Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-I mRNA and protein is enhanced in endometriosis versus endometrial stromal cells in culture. *Mol Hum Reprod.* 1998;4:1150-6

Vignali M, Infantino M, Matrone R, Chiodo I, Somigliana E, Bussaca M *et al.* Endometriosis: novel etiopathogenetic concepts and clinical perspectives. *Fertil Steril.* 2002;78:665-78.

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

Wheeler JM. Epidemiology of endometriosis-associated infertility. *J Reprod Med.* 1989;34:41-6.

Witz CA. Current concepts in the pathogenesis of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol.* 1999;42:566-85.

Yamamoto T, Noguchi T, Tamura T, Kitawaki J, Okada H. Evidence for Estrogen Synthesis in Adenomyotic Tissues. *Am J Obstet Gynecol.* 1993; 169:734-38.

Yang S, Fang Z, Suzuki T. Regulation of Aromatase p 450 Expression in Endometriotic and Endometrial Stromal Cells by CCAAT/Enhancer Binding Proteins (C/EBPs): decreased C/EBP β in endometriosis is associated with overexpression of aromatase. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002a;87:2336-45.

Yang HJ, Shozu M, Murakami K, Sumitani H, Segawa T, Kasai T *et al.* Spatially Heterogenous Expression of Aromatase p 450 through Promoter II Is Closely Correlated with the Level of Steroidogenic Factor-1 Transcript in Endometrioma Tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002b;87:3745-53.

Yano S, Ikegami Y, Nakao K. Studies of the Effect of the New Non-steroidal Aromatase inhibitor Fadrozole Hydrochloride in a Endometriosis Model in Rats. *Arzneim Forsch./Drug Res.* 1996;46:192-5.

Zeitoun KM, Bulun SE. Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target. *Fertil Steril.* 1999;72:961-69.

FONTES CONSULTADAS

Normatização para apresentação de dissertações e teses. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Pós-Graduação; 2004. 26p.

Houaiss A. Dicionário Eletrônico Houaiss da Língua Portuguesa [CD ROM]. Rio de Janeiro: Objetiva, 2001.

Dicionário Andrei de termos de Medicina. 2^a ed. São Paulo: Andrei Editora; 2002.

RESUMO

Riachi SHMS. Imunoexpressão da enzima aromatase P450 em espécimes cirúrgicos de mulheres portadoras de endometriose pélvica profunda. Dissertação de Mestrado 2008.

A endometriose representa um agravo de saúde pública com origem poligênica e multifatorial. Considerando-se tratar de moléstia associada a produção estrogênica, a atividade aumentada da expressão da aromatase P450 parece estar associada as formas graves e recorrentes da doença. **Objetivo:** Avaliar a expressão da proteína aromatase P450 através da técnica de imunistoquímica em espécimes cirúrgicos de mulheres portadoras de endometriose pélvica profunda, tais como: peritônio, ovário, ligamentos útero-sacrais e segmentos de reto e sigmóide, e comparar com o grau de diferenciação histológica nestas mulheres. **Casuística e Método:** Avaliamos 96 biópsias extraídas de 14 mulheres que foram submetidas ao tratamento cirúrgico laparoscópico da endometriose no setor de Endoscopia Ginecológica e Endometriose do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia (DOGI) da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo no período de fevereiro de 2004 a fevereiro de 2006. Todos os fragmentos foram submetidos a análise histológica para confirmação de endometriose. Aos blocos selecionados foi aplicada a técnica do TMA (tissue microarray). Para a avaliação da imunoexpressão utilizou-se anticorpo policlonais anti aromatase P450, na diluição 1/ 50 (MCA. 2077, Serotec Inc.) e a expressão foi classificada em positiva ou negativa e as amostras com escores de zero, um, dois ou três. **Resultados:** do total de fragmentos estudados a avaliação do grau histológico evidenciou padrão estromal em 17 biópsias (17,7%), glandular bem diferenciado em 27 biópsias (28,1%), glandular misto em 24 casos (25%) e em 28 biópsias (29,2%) glandular pouco diferenciado. A imunoexpressão foi negativa em 54 biópsias (56,2%) e positiva em 42 biópsias (43,8%). Dos casos positivos, 31 (32,3%) correspondiam ao escore +1, 8 (8,3%) ao escore +2 e 3 casos (3,1%) ao escore +3. Quando se comparou a expressão da aromatase P450 e a localização dos fragmentos estudados encontramos que nos fragmentos de peritônio foi positiva em 10 casos, sendo 10,4% do total, nos ligamentos útero sacrais em 14 casos (14,6%) e em reto e sigmóide em 11 biópsias (11,5%). Na avaliação da expressão e do escore utilizado encontramos escore zero (negativo) em 40,7% dos fragmentos de reto e sigmóide ($p=0,04$) quando comparado aos escores +1, +2 ou +3, no restante dos fragmentos de ovário, peritônio e ligamentos útero-sacrais não se observou diferença. **Conclusões:** 1) A expressão da proteína aromatase P450 avaliada através da técnica de imunistoquímica em espécimes cirúrgicos de mulheres portadoras de endometriose pélvica profunda apresenta baixa positividade. 2) Não observamos diferenças na imunoexpressão da aromatase P450 nos locais estudados. 3) Não houve associação entre o grau de diferenciação histológica e a imunoexpressão da aromatase P450.

ABSTRACT

Riachi SHMS. Immunoexpression of aromatase P450 in Superficial and Deep Infiltrating Endometriosis (DIE).

Study Objective: This study aims to evaluate the immunoexpression of aromatase P450 and its possible association to the localization of the biopsies and the hystologic differentiation pattern in patients with superficial and DIE. **Design:** Cross-section (Canadian Task Force Classification II-2). **Setting:** University Hospital. **Patients:** We evaluated 96 biopsies obtained from 14 patients submitted to laparoscopic treatment of endometriosis from February 2004 to February 2006. **Interventions:** Immunohistochemical qualitative evaluation of aromatase P450 and histological evaluation of the endometriosis differentiation pattern. **Measurements and Main Results:** The overall immunoexpression was negative in 54 biopsies (56.2%) and positive in 42(43.8%). In 31 out of 96 biopsies (32.3%) we observed a score +1, in 8 (8.3%) score +2 and in 3 biopsies (3.1) the score was +3. Comparing the immunoexpression of the aromatase P450 and the localization of the biopsies we observed that among the positive results 10 (23.8%) were from peritoneal lesions, 14 (33.3) from the uterosacral ligaments, 11 (26.2%) from the rectosigmoid and 7 (16.7%) from the ovaries. The Chi-Square and the Fisher exact test evidenced no association between the immunoexpression of aromatase P450 and the localization of the lesions ($p>0.05$). There was also no association between the hystologic differentiation pattern and the immunoexpression of aromatase P450 ($p>0.05$). Comparing specifically the localization of the lesions and the score of immunoexpression of aromatase P450 we observed that in the rectosigmoid 22 out of 33 (40.7%) biopsies were negative ($p=0.04$). **Conclusions:** The immunoexpression of the aromatase P450 presented a low positivity in the studied fragments. The localization of the DIE lesions showed no association to the immunoexpression of aromatase P450. We evidenced no association between the hystologic differentiation pattern and the immunoexpression of aromatase P450.

APÊNDICE

Tabela de pacientes avaliadas com biópsias coletadas e correspondente de imunexpressão da aromatase P450.

Data	Nº	Nome	Nº do bloco	Subdivisão bloco	Registro	Biópsia	AP	Idade	Imunoi- toquímica	Escore 0/1/2/3	Nº do Punch
16/06/03	1	ERSA	AP 03-47949	C1	598411	reto- sigmóide	gl mista	41 anos	neg	0	54
	1			C2		reto- sigmóide	gl mista		neg	0	55
	1			C3		reto- sigmóide	gl mista		pos	1+	56
	1		AP 03-47951			reto- sigmóide	gl mista		pos	1+	57
	1		AP 03-47952	1		reto- sigmóide	gl mista		neg	0	61
	1		AP 03-47952	2		reto- sigmóide	gl mista		neg	0	62
	1		AP 03-47953	1		utero sacro	gl mista		neg	0	58
	1		AP 03-47953	2		utero sacro	gl mista		pos	1+	59
	1		AP 03-47953	3		utero sacro	gl mista		pos	1+	60
	1		AP 03-47954			ureter			neg	0	63
15/07/03	2	CRW	AP 03-38311	A	596298	utero sacro	gl mista	31 anos	neg	0	36
	2			B		utero sacro	gl mista		neg	0	37
	2			C		utero sacro	gl mista		neg	0	38
	2		AP 03-38312	A		utero sacro	gl mista		neg	0	34
	2			C		utero sacro	gl mista		pos	1+	35
	2		AP 03-38313	C1		reto- sigmóide	gl mista		neg	0	32
	2			C2		reto- sigmóide	gl mista		neg	0	33

Cont.

Continuação

Data	Nº	Nome	Nº do bloco	Subdivisão bloco	Registro	Biópsia	AP	Idade	Imunohistoquímica	Escore	Nº do Punch
	2			C3		reto-sigmóide	gl mista		neg	0	31
	2		AP 03-38314	C		ureter			neg	0	30
13/12/02	3	DBF	AP 02-72364		439009	peritônio	gl pouco diferenciada	26 anos	pos	1+	86
	3		AP 02-72365			peritônio	estromal		pos	1+	85
	3		AP 02-72366			ovário	estromal		pos	2+	84
13/06/03	3	DBF	AP 03-32316	1	550834	utero sacro	gl bem diferenciada	26 anos	neg	0	51
	3		AP 03-32317			reto-sigmóide	gl pouco diferenciada		neg	0	52
	3		AP 03-32318			peritônio	estromal		neg	0	53
04/02/03	4	BVAO	AP 03-6430	A	464108	utero sacro	estromal	44 anos	pos	1+	81
	4			B		utero sacro	gl bem diferenciada		pos	1+	82
	4		AP 03-6431	B		reto-sigmóide	gl bem diferenciada		pos	2+	80
	4			1		reto-sigmóide	gl bem diferenciada		neg	0	79
	4		AP 03-6432	2		utero sacro	gl pouco diferenciada		pos	1+	78
	4		AP 03-6433			utero sacro	gl bem diferenciada		pos	1+	77
10/04/03	5	AFM	AP 03-20022	E	509301	ureter		32 anos	pos	1+	47
	5		AP 03-20023			peritônio	gl pouco diferenciada		pos	2+	46
	5		AP 03-20024	E		utero sacro	gl pouco diferenciada		neg	0	45
	5			bloco 3		utero sacro	estromal		pos	1+	44

Cont.

Continuação

Data	Nº	Nome	Nº do bloco	Subdivisão bloco	Registro	Biópsia	AP	Idade	Imunohistoquímica	Escore	Nº do Punch
	5			bloco 3a		utero sacro	gl pouco diferenciada		pos	1+	43
	5			B1		reto-sigmóide	gl pouco diferenciada		neg	0	42
	5			B2		reto-sigmóide	gl mista		pos	3+	41
6/3/2002	6	MSS	AP 02-36619	R2	A4B-3562	utero sacro	gl pouco diferenciada	38 anos	neg	0	97
	6		AP02-36620	B		utero sacro	estromal		neg	0	95
	6			C		utero sacro	gl pouco diferenciada		neg	0	96
	6		AP02-36625	A1		reto-sigmóide	estromal		pos	1+	93
	6			A2		reto-sigmóide	gl bem diferenciada		neg	0	94
	6		AP02-36627	A		ovário	gl pouco diferenciada		neg	0	90
	6			B		ovário	gl pouco diferenciada		pos	2+	91
	6			C		ovário	gl pouco diferenciada		pos	1+	92
	6		AP02-36628	A		peritônio	gl pouco diferenciada		pos	1+	87
	6			B		peritônio	gl bem diferenciada		pos	2+	88
	6			C		peritônio	gl bem diferenciada		neg	0	89
03/06/03	7	KRAL	AP 03-3010	A	54-3590	utero sacro	gl bem diferenciada	43 anos	neg	0	83

Cont.

Continuação

Data	Nº	Nome	Nº do bloco	Subdivisão bloco	Registro	Biópsia	AP	Idade	Imunohistoquímica	Escore	Nº do Punch
09/07/03	8	EFA	AP 03-37018		565709	peritônio	gl pouco diferenciada	34 anos	pos	1+	29
	8		AP 03-37019	A1		reto-sigmóide	gl bem diferenciada		neg	0	27
	8			A2		reto-sigmóide	gl bem diferenciada		neg	0	28
	8		AP 03-37023	A		ovário	gl mista		neg	0	23
	8			B		ovário	gl mista		pos	1+	22
	8		AP 03-37024	R1		peritônio	gl mista		neg	0	26
	8		AP 03-37024			peritônio	gl mista		pos	1+	48
	8		AP 03-37025	A		ovário	gl bem diferenciada		neg	0	24
	8			B		ovário	gl bem diferenciada		pos	2+	25
03/12/03	9	LFA	AP 03-65635	1	653592	utero sacro	estromal	35 anos	pos	1+	15
	9			2		utero sacro	estromal		neg	0	16
	9		AP 03-65636	1		utero sacro	estromal		pos	1+	17
	9		AP 03-65637	B1		reto-sigmóide	gl bem diferenciada		pos	1+	18
	9			B3		reto-sigmóide	gl bem diferenciada		neg	0	20
	9			B4		reto-sigmóide	gl bem diferenciada		neg	0	19
	9		AP 03-65655	C		peritônio	gl bem diferenciada		pos	1+	21
22/10/03	10	ACPS	AP 03-59446	1	633919	utero sacro	estromal	27 anos	neg	0	3
	10			2		utero sacro	estromal		pos	1+	4
	10		AP 03-59447			utero sacro	gl pouco diferenciada		pos	1+	5

Cont.

Continuação

Data	Nº	Nome	Nº do bloco	Subdivisão bloco	Registro	Biópsia	AP	Idade	Imunois- toquímica	Escore	Nº do Punch
	10		AP 03-59448			utero sacro	gl pouco diferenciada		neg	0	6
	10		AP 03-59449	A1		peritônio	gl pouco diferenciada		neg	0	7
	10			A3		peritônio	gl pouco diferenciada		neg	0	8
	10			A2		peritônio	gl pouco diferenciada		pos	2+	9
	10			B		peritônio	gl pouco diferenciada		pos	1+	10
	10		AP 03-59450	B1		reto- sigmóide	gl bem diferenciada		pos	3+	1
	10			B2		reto- sigmóide	gl bem diferenciada		neg	0	2
15/01/04	11	NEPSS	AP 03-7912		469074	utero sacro	gl pouco diferenciada	36 anos	neg	0	76
	11		AP 03-7913	1		utero sacro	gl pouco diferenciada		neg	0	73
	11			2		utero sacro	gl pouco diferenciada		neg	0	74
	11			3		utero sacro	estromal		neg	0	75
	11			B1		reto- sigmóide	gl pouco diferenciada		neg	0	72
	11			B2		reto- sigmóide	gl pouco diferenciada		neg	0	71
	11			B3		reto- sigmóide	gl pouco diferenciada		pos	1+	70
	11		AP 03-7971			ureter			neg	0	69

Cont.

Continuação

Data	Nº	Nome	Nº do bloco	Subdivisão bloco	Registro	Biópsia	AP	Idade	Imunois- toquímica	Escore	Nº do Punch
25/02/03	12	ZD	AP 03-10952		479758	ovário	gl pouco diferenciada	52 anos	neg	0	64
	12		AP 03-10953			utero sacro	estromal		neg	0	65
	12		AP 03-10954			utero sacro	estromal		neg	0	66
	12			B		reto- sigmóide	gl mista		neg	0	68
	12			C1		reto- sigmóide	gl pouco diferenciada		pos	1+	49
	12			C2		reto- sigmóide	gl bem diferenciada		neg	0	67
28/06/01	13	MAJ	AP 01-33271		A4B- 3562	ovário	estromal	40 anos	pos	1+	100
	13		AP 01-33272			peritônio	gl mista		pos	1+	99
16/11/01	13	MAJ	AP 01-59346		A4B- 3562	utero sacro	estromal	40 anos	pos	1+	98
28/10/03	14	ECPO	AP 03-60236	E	636450	reto- sigmóide	gl bem diferenciada	41 anos	pos	3+	11
	14			R2		reto- sigmóide	gl bem diferenciada		neg	0	14
	14			R3		reto- sigmóide	gl bem diferenciada		pos	1+	12
	14			R5		reto- sigmóide	gl bem diferenciada		neg	0	13
29/04/03	14	ECPO	AP 03-23560	1	520380	ovário	gl bem diferenciada	41 anos	neg	0	50
	14			2		ovário	gl bem diferenciada		neg	0	40
	14			3		ovário	gl bem diferenciada		pos	2+	39

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)