

HELIZABET SALOMÃO ABDALLA AYROZA RIBEIRO

**ANÁLISE DOS FATORES ANTIAPOPTÓTICOS
E PRÓ-APOPTÓTICOS NA ENDOMETRIOSE
PÉLVICA E NO ENDOMÉTRIO NORMAL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, para obtenção do grau de Doutor em Medicina.

**São Paulo
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

HELIZABET SALOMÃO ABDALLA AYROZA RIBEIRO

**ANÁLISE DOS FATORES ANTIAPOPTÓTICOS
E PRÓ-APOPTÓTICOS NA ENDOMETRIOSE
PÉLVICA E NO ENDOMÉTRIO NORMAL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, para obtenção do grau de Doutor em Medicina.

Área de Concentração: **TOCGINECOLOGIA**

Orientador: **PROF. DR. PAULO AUGUSTO AYROZA GALVÃO RIBEIRO**

**São Paulo
2010**

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

Ribeiro, Helizabet Salomão Abdalla Ayroza

Análise dos fatores antiapoptóticos e pró-apoptóticos na endometriose pélvica e no endométrio normal./ Helizabet Salomão Abdalla Ayroza Ribeiro. São Paulo, 2010.

Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-Graduação em Medicina.

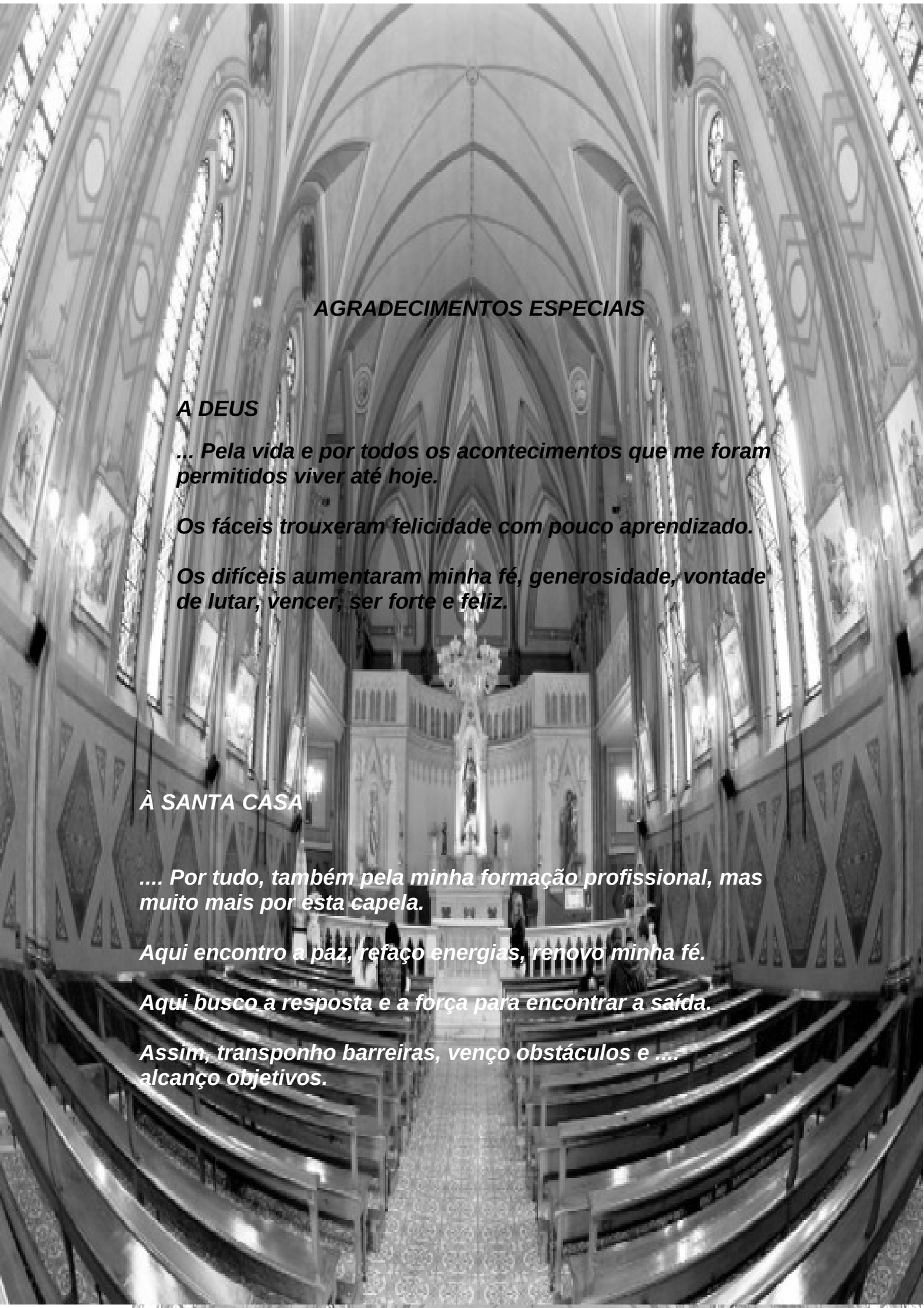
Área de Concentração: Tocoginecologia

Orientador: Paulo Augusto Ayroza Galvão Ribeiro

1. Endometriose/fisiopatologia 2. Endometriose/etiologia 3.

Laparoscopia 4. Apoptose 5. Imunoistoquímica/métodos

BC-FCMSCSP/42-10



AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A DEUS

... Pela vida e por todos os acontecimentos que me foram permitidos viver até hoje.

Os fáceis trouxeram felicidade com pouco aprendizado.

Os difíceis aumentaram minha fé, generosidade, vontade de lutar, vencer, ser forte e feliz.

À SANTA CASA

.... Por tudo, também pela minha formação profissional, mas muito mais por esta capela.

Aqui encontro a paz, refaço energias, renovo minha fé.

Aqui busco a resposta e a força para encontrar a saída.

Assim, transponho barreiras, venço obstáculos e alcanço objetivos.

DEDICATÓRIA

Aos Meus Pais

Lourdes Abdalla e João Abdalla (*in memorian*)

Minha adorável mãe, presença constante em minha vida.

Obrigada por seu amor, carinho e zelo comigo e com minhas filhas.

O tempo nos deu a oportunidade de vivenciar nossas companhias e solidificar ainda mais o amor.

Pai, quando você se foi, a idéia de nunca mais ouvir sua voz feriu como uma lança em meu coração. Eu entendi que não poderia suportar a idéia de nunca mais sentir seu abraço. Você era para mim como um solo firme. É, algumas pessoas são como a água da vida. Um forte abraço!

Ao meu marido, **Paulo**

“ ...A gente só conhece bem as coisas que cativou..
Se tu me cativas, nós teremos necessidade um do outro.
Serás para mim único no mundo.
E eu serei para ti única no mundo...”

(Saint Exupéry)

Meu querido e muito amado **Paulo**, você trouxe para minha vida o sentimento mais nobre, o mais sublime, o fundamental, o amor. Junto com ele, caminham o respeito e a amizade. Só quem ama é capaz de respeitar uma amizade sincera e viver em plenitude. Você torna minha vida leve e fácil, mesmo quando ela insiste em ser dura e difícil. Encontrei você, para encontrar em mim, o amor!

As minhas amadas filhas, **Luisa e Heloisa**

“Foi o tempo que perdeste com tua rosa que a fez tão importante.”

(Saint Exupéry)

Minhas princesas!

Vocês são a razão do meu amor incondicional, da perpetuação da minha dedicação.

Responsáveis pela maravilhosa e única experiência de ser
..... simplesmente....mãe!

Minha adorável Lulu, você me surpreende a cada dia. Suas palavras oportunas nos momentos difíceis, seu carinho quando a situação é delicada. Você está se transformando em uma linda menina. Filha cuidadosa e uma verdadeira amiga.

Minha adorável Helô, meu raio de luz, amor de bebê!

Eu te desejei e te busquei.

Você veio, sorridente e linda, completar minha felicidade, os meus sonhos!

Seu sorriso me renova, sua alegria completa minha paz.

Amo vocês!

Ao meu filho, **Paulinho**.

“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas...

Cativar? O que é cativar? Cativar é criar laços...”

(Saint Exupéry)

Meu adorável Paulinho, filho do coração, que me deu o privilégio de exercitar mais uma vez o amor incondicional.

Criar laços...laços de amor, os verdadeiros laços!

Aos meus irmãos

Ivonilce, Tadeu e Maristela

“ Se temos de esperar, que seja para colher a semente boa que lançamos hoje no solo da vida. Se for para semear, então que seja para produzir milhões de sorrisos, de solidariedade e amizade.”

(Cora Coralina)

Meus irmãos, de uma maneira ou de outra, vocês semearam em mim uma sementinha de amor.

Obrigada pelo carinho, cuidados e consideração comigo.

Vocês foram às vezes pais, muitas vezes amigos e sempre meus irmãos.

Às Pacientes

Vocês que participaram deste estudo, auxiliando de forma respeitosa o engrandecimento de nossos conhecimentos.

Obrigada pela confiança e paciência.

“É preciso que eu suporte duas ou três larvas, se quiser conhecer as borboletas”

(Saint Exupéry)

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador

Professor Doutor Paulo Augusto Ayroza Galvão Ribeiro

É fácil formar um homem que se subordina cegamente, sem questionar, a um mestre ou líder. Por outro lado, libertá-lo para que aprenda a ser mestre de si mesmo é uma empreitada muito mais difícil”

(Saint Exupéry)

O verdadeiro mestre conhece o perfil de seu aluno e aplica a didática necessária para transformá-lo. Transmite conhecimentos práticos e teóricos, de vida e formação humana. Ensina com sua sabedoria e aprende com seus ensinamentos. Este é você Paulo. Sua capacidade de transmitir seu vasto conhecimento, de lidar de uma forma inteligente com a personalidade de cada um de seus alunos, atingindo seus objetivos e plantando a semente do conhecimento, faz de você um grande e verdadeiro mestre. Obrigada por seus ensinamentos que muito me engrandeceram.

AGRADECIMENTOS

À Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo em nome de seu provedor **Dr Kalil Rocha Abdalla**, meus sinceros agradecimentos pela acolhida.

À Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia São Paulo em nome do seu diretor **Prof. Dr. Ernani Geraldo Rolim**.

Ao **Professor Doutor Tsutomu Aoki**, Diretor do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Santa casa de Misericórdia de São Paulo, pelo apoio e incentivo ao longo destes anos.

Ao **Professor Doutor Antônio Pedro Flores Auge**, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia por seu contínuo apoio e dedicação ao desenvolvimento científico do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Aos Ilustríssimos **Professores Doutores, Adriana Bitencourt Campaner, Maria Antonieta Longo Galvão, Maurício Simões Abrão, Vilmar Marques Oliveira**, por suas importantes e significativas considerações, na ocasião do exame geral de qualificação.

Aos médicos que fazem parte da clínica de Endoscopia Ginecológica e Endometriose da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo: **Carolina Haddad, Dorival Gomide, Fabio Sakae, Guilherme Karan, Ruy Machado e Vanessa Sekula**, pelo apoio e ajuda em nossas atividades diárias.

Ao **Professor Doutor Hudson de Souza Buck**, pelos ensinamentos e incentivo na realização da técnica da densidade óptica relativa.

Ao **Flávio Richeti**, pela disponibilidade e ajuda no armazenamento do material deste estudo.

À **Sra. Ana Bracht**, pela constante ajuda e dedicação na confecção deste trabalho.

À **Sra. Sadia Mustafá**, pela exaustiva e cuidadosa revisão bibliográfica.

À **Professora. Marisa Cukier**, pela cuidadosa correção dos textos.

Às instrumentadoras **Adriana Laureano** e **Vânia Marabesi**, pela ajuda na ocasião da coleta do material.

Às minhas secretárias de ontem e hoje, **Ediene Fernandes**, **Sheila Marques** e **Valéria Gonçalves**, pela ajuda no agendamento das consultas e cirurgias das pacientes deste estudo.

Às minhas ajudantes, **Márcia**, por sua dedicação a minha família ao longo destes 15 anos, **Vilma**, **Conceição** e **Irani** pela dedicação e empenho de todas vocês no cuidado com minhas coisas e com as pessoas que amo.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APAF -1: *Polyclonal antibody to apoptosis protease – activating factor 1*

BAX : *B- cell lymphoma 2 associated protein X*

BCL2 : *B–cell lymphoma / leukemia-2*

CICLINA D1 : *G1/S-specific cyclin-D1*

GnRH a : Análogo do GnRH

HER-2 : *human epidermal receptor-2*

LUS : Ligamento útero-sacro

TMA : *Tissue microarray*

TNF – α : Fator de necrose tumoral alfa

ROD : *Relative Optical Density*

μm : Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – Revisão da Literatura	10
1.1.1 Apoptose	10
1.1.2 Apoptose e Endometriose	14
2. OBJETIVO	22
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	24
3.1 – Casuística	25
3.1.1 – Critérios de inclusão e exclusão	26
3.1.2 – Dados epidemiológicos	26
3.2 – Método	26
3.2.1 – Análise histopatológica	26
3.2.2 – <i>Tissue Microarray (TMA)</i>	27
3.2.3 – Estudo imunoistoquímico	27
3.2.4 – Avaliação semiquantitativa da imunoexpressão por ROD.	31
3.3 – Análise Estatística	33
4. RESULTADOS	34
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES	54
7. ANEXOS	56
Anexo 1 - Termo de consentimento livre esclarecido	57
Anexo 2 – Figuras da hematoxilina /eosina	59
Anexo 3 - Descrição da técnica de TMA	60
Anexo 4- Reação imunoistoquímica e figuras	62
Anexo 5 - Densidade óptica relativa (ROD)	69
Anexo 6 -Tabela das pacientes analisadas neste estudo	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
FONTES CONSULTADAS	92
RESUMO	94
ABSTRACT	96
APÊNDICE	98

1. INTRODUÇÃO

A endometriose pélvica, descrita inicialmente em 1860, na Áustria, pelo patologista von Rokitansky^{***} (citado por Ridley, 1968 e por Samper et al, 1984), envolvendo útero, ovários e trompas, também foi estudada por Cullen, o qual teria referido, alguns anos após, a presença de tecido endometrial ectópico em diversas localizações, incluindo: útero, ovário, tuba uterina, ligamento redondo, ligamento útero-ovário, ligamento útero-sacro, septo retovaginal, parede de reto e sigmoide, músculo retoabdominal e umbigo (Cullen, 1920).

Na mesma linha de investigação seguiu Sampson que, em 1921, definiu a endometriose como a presença de tecido com aspectos histológicos e funcionais semelhantes ao endométrio tópico, fora de seu sítio habitual. Sampson, em 1922, descreveu a doença como a formação de aderências extensas na escavação retrouterina, obliterando sua porção inferior e unindo a cérvix uterina, ou a porção inferior do corpo uterino, ao reto. Baseado em suas observações, Sampson elaborou a teoria do refluxo menstrual a partir da qual surgiriam os implantes endometriais ectópicos (Sampson, 1927).

* von Rokitansky APUD Ridley JH. *The histogenesis of endometriosis. Obstet Gynecol Surv* 1968; 23:1-35.

** von Rokitansky APUD Samper ER, Slagle GW, Hand AM. *Colonic endometriosis: its clinical spectrum. South Med J* 1984; 77:912-4.

Recentemente a endometriose foi conceituada pela presença fora do útero, em diversos sítios anatômicos de tecido semelhante ao endométrio, provocando a inflamação crônica, segundo a *European Society of Human Reproduction and Embriology* (Kennedy et al, 2005).

Não obstante ser uma das enfermidades mais estudadas nos últimos anos, a endometriose figura como moléstia de origem enigmática, com mecanismos etiológicos ainda incertos (Halme, 1985; Witz, 1999).

A endometriose constitui atualmente uma das afecções ginecológicas mais comuns, acometendo de 7% a 10% da população feminina (Boling et al,1988). Sua prevalência varia de acordo com a população estudada, podendo alcançar 16% em mulheres assintomáticas e até 30% em mulheres inférteis (ACOG,1993; Barbosa,1999).

A doença tem início mais frequentemente após a menarca e sua incidência diminui significativamente após os 55 anos (Eskenazi, Warner,1997; Abrão et al, 2000). Não obstante, observam-se formas avançadas da enfermidade após a menopausa (Henriksen,1955; Lansac et al, 1987; Badawy et al, 1988), existindo relatos de comprometimento intestinal em pacientes de até 76 anos (Williams Jr, 1963). Tradicionalmente a endometriose é vista como uma afecção estrógeno-dependente e não responsiva à ação da progesterona (Osteen et al, 2005).

Por mais de um século, várias teorias foram elaboradas na tentativa de explicar as alterações envolvidas na gênese da endometriose. Inicialmente foram estudados os mecanismos causadores da implantação ectópica do endométrio em suas diferentes

formas de apresentação (Russel, 1899^{*}; Sampson, 1927; Ridley, 1968).

A teoria do refluxo menstrual ou menstruação retrógrada (Sampson, 1927) é a mais difundida ainda hoje, mas existem outras teorias propagadas, como a da metaplasia celômica, segundo a qual a endometriose se desenvolveria da metaplasia do epitélio celômico pluripotencial, induzida por substâncias não conhecidas (Gruenwald, 1942; Craninx et al, 2000).

Javert, em 1949, propôs uma teoria para a histogênese da endometriose que combina diversos aspectos previamente descritos por outros autores: disseminação hematogênica e linfática, refluxo menstrual com implantação de células endometriais e disseminação direta por contiguidade ao miométrio, com invasão de órgãos adjacentes.

Segundo Witz, em 1999, o refluxo menstrual e a implantação peritoneal de células endometriais permanecem como os principais mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da endometriose, e o aparecimento dos implantes endometriais ectópicos surge da manifestação final de um conjunto de fatores fisiopatológicos, cuja complexa e dinâmica interação, ao longo do tempo, determina modalidades evolutivas, distintas da afecção.

Concomitantemente, alguns autores centraram seus estudos nos aspectos imunológicos sistêmicos e nos fatores locais do peritônio que podem estar envolvidos tanto na histogênese como nas sequelas causadas pela endometriose (Weed, Arquembourg, 1980; Steele et al, 1984; Badaway et al, 1988).

^{*}Russel 1899 [artigo histórico] de Longo LD. Classic pages in obstetrics and gynecology. Aberrant portions of the müllerian duct found in an ovary: William Wood Russell Johns Hopkins Hospital Bulletin, vol. 10, pp. 8-10, 1899. Am J Obstet Gynecol. 1979;134:225-6

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.

O principal raciocínio da teoria imunológica atualiza a proposição do refluxo menstrual. Acredita-se que as células endometriais ao penetrarem na cavidade pélvica, além de estarem programadas para a morte celular (apoptose) por conta da exposição à progesterona, desencadeiam uma intensa reação inflamatória e atraem grande número de células do sistema imunológico para a região pélvica. Desta forma, principalmente os macrófagos são ativados e iniciam a destruição da maior parte das células endometriais por fagocitose, fazendo com que todas desapareçam nos primeiros dias após a menstruação. Na endometriose, entretanto, os macrófagos parecem exercer uma capacidade diminuída para a fagocitose das células endometriais, o que seria um dos principais facilitadores para o processo de implantação e desenvolvimento destas células na cavidade peritoneal, dando origem ao foco endometriótico inicial (Harada et al, 2004).

Supõe-se fortemente, na atualidade, que um distúrbio da resposta imunológica seja o fator facilitador para o desenvolvimento da endometriose, sugerindo a existência de um perfil imunológico específico (Siristatidis et al, 2006), associado a fatores angiogênicos e genéticos (Seli, Arici, 2003).

.As manifestações clínicas da doença são múltiplas e independem de sua localização; a dor pélvica e a infertilidade estão presentes em grande parte dos casos (Romo Cabrera et al, 1989; Bedone et al, 1994; Abrão et al, 1995).

Esta moléstia pode manifestar-se de múltiplas formas, sendo dor pélvica e

infertilidade os achados mais comuns. Dentre seus variados sintomas a dismenorreia é observada com maior frequência, independentemente de sua localização, podendo apresentar alterações do padrão menstrual, dispareunia profunda, dor pós-coito e algia pélvica contínua (Wheeler, 1989).

Aproximadamente 66% das mulheres portadoras de endometriose apresentam seus primeiros sintomas até os 20 anos de idade, dentre as quais 38% são sintomáticas antes dos 15 anos (Ballweg, 2005).

Na década de 90, a endometriose pélvica infiltrativa foi conceituada e classificada de acordo com o grau de invasão no peritônio, em infiltração superficial, intermediária e profunda. Assim surgiu o conceito de endometriose pélvica profunda na qual se observa lesão com penetração em profundidade, igual ou superior a 5 mm, a partir do peritônio (Cornillie et al, 1990).

A dispareunia profunda, a dor pós-coito e a dor pélvica contínua, não associadas ao ciclo menstrual, são sintomas comuns nas portadoras de endometriose ou de aderências pós-infecciosas. No entanto, a dismenorreia foi observada com maior frequência, ocorrendo em até 70% das portadoras de endometriose, independentemente de sua localização (Mahmood et al, 1991).

A doença profunda, segundo alguns autores, possui características específicas, é extremamente ativa, apresenta sincronismo com o endométrio tópico e progressão com o passar dos anos. Esta forma de manifestação da doença atinge com maior frequência a escavação retrouterina, ligamentos útero-sacrais e prega vésico-uterina (Cornillie et al, 1990; Koninckx et al, 1991; Chapron et al, 2006; Ribeiro et al, 2006).

A endometriose do septo retovaginal foi considerada por Koninckx, Martin, em 1994, como decorrente da infiltração de implante peritoneal profundo. Dois anos mais tarde, o grupo de Donnez demonstrou diferenças estruturais, morfométricas e histoquímicas entre a doença do septo retovaginal e a peritoneal. Os mesmos autores, devido às semelhanças histológicas entre a doença de septo e a adenomiose, principalmente no que se refere à quantidade de musculatura lisa presente, denominaram esta afecção de adenomiose do septo retovaginal (Donnez et al, 1996).

O diagnóstico da endometriose pode ser alcançado por meio da associação do quadro clínico e de exames complementares. Marcadores séricos, exames radiográficos, colonoscopia, ultrassonografia e laparoscopia são exames indicados para a avaliação da endometriose. Muitas vezes, não se estabelece o diagnóstico e o estágio precisos do comprometimento intestinal. Na vigência de doença extensa, com infiltração profunda, faz-se necessário o emprego de métodos mais sensíveis como ressonância magnética pélvica e endossonografia intestinal (Badaway et al, 1988; Canis et al, 1996; Tardif et al, 1999).

Alguns autores classificaram o tecido endometrial ectópico de acordo com sua atividade dominante como dois fenótipos bem definidos. Os dois tipos dominantes de lesões ectópicas endometriais dependem basicamente da topografia das mesmas. O primeiro deles, definido como adenomiose, situa-se ao longo do trajeto do ducto müleriano, incluindo útero, fôrnices vaginais, septo retovaginal e a extensão dos ligamentos uterinos. O segundo, cujo fenótipo dominante é definido como

endometriose, situa-se fora da extensão do ducto de Müller, principalmente em peritônio e ovários (Brosens, Brosens, 2000).

Embora controverso, as localizações mais frequentes da endometriose são os ovários e o peritônio pélvico (Anaf et al, 2000; Redwine, Wright 2001). As lesões infiltram-se frequentemente nos ligamentos útero-sacro (Ribeiro et al, 2006; Chapron et al, 2006), invadem o recesso retouterino, o septo retovaginal e o tecido retrocervical (Koninckx, 1991), a vagina e o retossigmoide, em mais de 50% das pacientes com estágios avançados da doença (Cornillie et al, 1990; Koninckx et al, 1991; Ribeiro et al, 2001).

Em contrapartida, Chapron, 2003 relatou que 20% das mulheres com endometriose têm infiltração profunda envolvendo ligamento útero-sacro, *torus* uterino, bexiga e reto. Observou, ainda, que o envolvimento colorretal representa 93% de todas as formas de endometriose intestinal, e que esta é também a forma mais agressiva, necessitando, segundo outros autores, de cirurgia extensa (Ribeiro et al, 2006).

No que se refere à doença extragenital, a endometriose intestinal é a forma mais comum, acometendo entre 3,8% e 37% das portadoras de endometriose (Kratzer, Salvati, 1955; Macafee, Greer 1960; Williams, Pratt, 1977; Beltran et al, 2006) sendo que o acometimento colorretal ocorre em 90% a 93% de toda a localização intestinal. As terapias medicamentosas são pouco efetivas sendo a cirurgia, inclusive a ressecção colorretal, frequentemente preconizada (Remorgida et al, 2007). Desde as primeiras descrições de ressecção colorretal por Redwine, Wright, (2001), a possibilidade de realização desta via de abordagem tem sido confirmada por vários autores, mas permanece assunto de debate. Lesões

profundas são tratadas com ressecção do segmento acometido (Redwine et al, 1996; Lyons et al, 2006; Ribeiro et al, 2006). A laparoscopia tem sido o procedimento de escolha no seguimento da endometriose (Redwine et al, 1996; Anaf et al, 2000; Chapron, Dubuisson, 2001; Chapron et al, 2004, Ribeiro et al, 2006; Brouwer, Woods, 2007).

Após revisarmos estes conhecimentos sobre a endometriose, entendemos a importância da doença e a necessidade de mais estudos sobre sua fisiopatologia, para obtermos novas alternativas na condução e tratamento da mesma.

O estudo da apoptose, dos fatores antiapoptóticos e pró-apoptóticos, nos levará a novas descobertas sobre o diagnóstico e tratamento da endometriose. Mas antes de entendermos melhor a apoptose e o ciclo celular, consideramos oportuno reverenciar o patologista alemão Rudolf Virchow* que em 1858 citou a seguinte frase: "...onde existe uma célula existia uma célula prévia....exatamente como os animais só surgem de animais e as plantas de plantas..." trazendo uma profunda mensagem de continuidade da vida.

Em nosso trabalho, abordaremos mais especificamente os fenômenos envolvidos no controle da vida celular e o fenômeno conhecido como apoptose.

* Rudolf Virchow APUD UNESP. Instituto de Biociências de Botucatu. Ciclo celular e mitose. [material didático on line] [citado em 10 fev 2010] Disponível em: www.ibb.unesp.br/departamentos/.../ciclo_celular_e_mitose.pdf

1.1 – Revisão da Literatura

1.1.1 - Apoptose

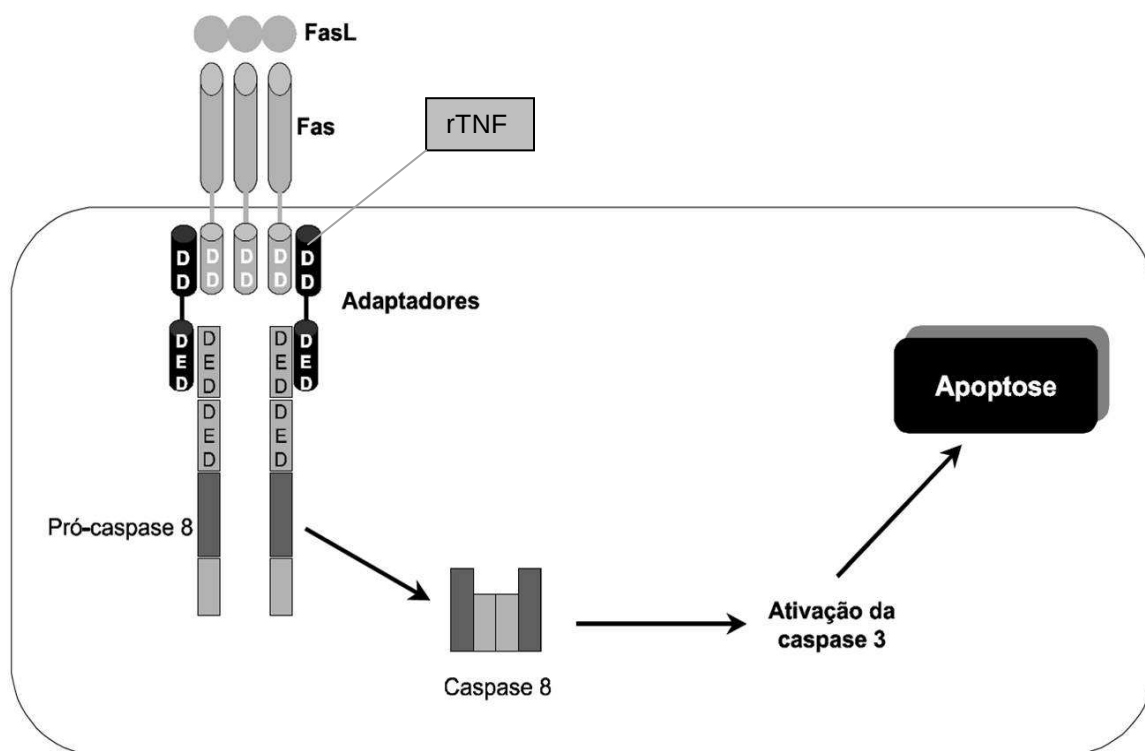
Em 1964, foi proposto o termo “morte celular programada” para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental (Lockshin, Williams, 1964). Um pouco mais tarde, a apoptose foi definida como um processo fisiológico que mantém o balanço entre a proliferação celular e a morte celular programada (Kerr et al, 1972), sem induzir a resposta imune ou a reação inflamatória (Garcia–Velasco, et al, 2002), e está envolvido em ambos, no desenvolvimento normal e na doença (Guimarães, Linden, 2004).

A apoptose caracteriza-se pelo controle da atividade celular por meio da morte induzida da célula após estímulo específico, principalmente pela diminuição da concentração de fatores de crescimento e pelo aumento do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Dufournet et al, 2006).

Em outro mecanismo envolvido no processo da apoptose participam as proteínas da família Bcl-2, que são codificadas pelo gene bcl-2. A proteína Bax (*B-cell lymphoma 2- associated protein X*) e a proteína Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*). Estas proteínas regulam a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria (Chao et al, 1998).

A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial) (Grivicich et al, 2007). A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de

necrose tumoral (rTNF). Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases (Budihardjo et al,1999) (Fig. 1).



(Adaptado de Grivicich et al,2007)

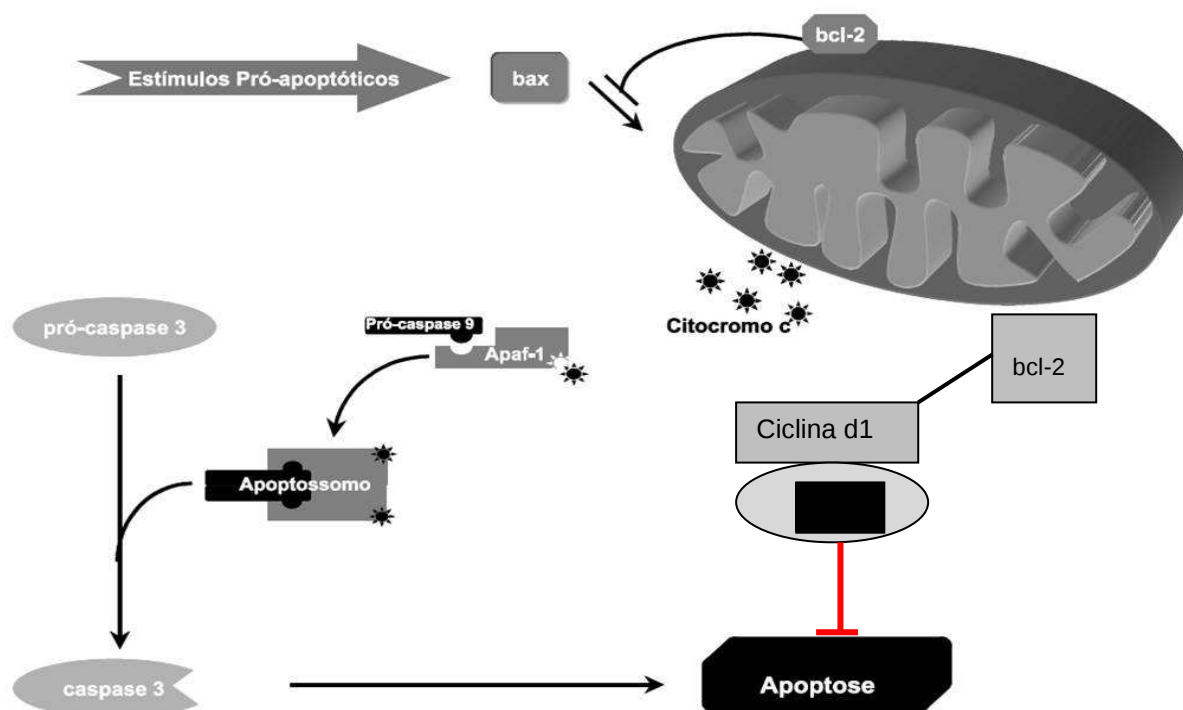
DD= domínio de morte; DED= efetor do domínio de morte

FIGURA 1 Via extrínseca de ativação da apoptose

Todos os membros da família receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF) possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que eles reconheçam seus ligantes. Tal fato resulta na trimerização e consequente ativação dos receptores de morte específicos (Fig. 1). A sinalização a seguir é mediada pela porção citoplasmática desses receptores que contêm uma sequência de 65 aminoácidos chamada "domínio de morte" sendo, por isso, chamados de "receptores de morte celular" (Naismith, Sprang,1998).

Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutar a caspase-8 que ativará a caspase-3, executando a morte por apoptose (Wieder et al, 2001).

A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são transduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria (Hengartner 2000). Inúmeros estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como o principal mediador desse tipo de morte. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (Desagher , Martinou, 2000) (Fig. 2).



(Adaptado de Grivicich et al, 2007)

Apaf-1=fator de ativação de protease associada à apoptose 1

FIGURA 2 Via intrínseca de ativação da apoptose

A **Bcl-2** é uma proteína oncogênica que inibe apoptose, aumentando assim a sobrevivência da célula. Está localizada dentro da membrana da mitocôndria, retículo endoplasmático e envelope nuclear. A associação das proteínas oncogênica (Bcl-2) e pró-oncogênica (Ciclina d1) com as IAPs (*inhibitor of apoptosis protein*) consegue bloquear a cascata de ativação de caspases e inibir a apoptose (Fig. 2) (Richter et al, 2001). A **Ciclina d1**, proteína pró-oncogênica, codificada pelo gene bcl-1, tem ação na regulação do ciclo celular. A super expressão da Ciclina d1 é o resultado do rearranjo do bcl-1 e bcl-2 na translocação t(11;14) (Terrano et al, 2010). A **Bax** é uma proteína pró-apoptótica que, em conjunto com a Bcl-2, é responsável pelo equilíbrio celular. Após um estímulo de morte celular, a Bcl-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, pelo sequestro de Bax ou por competir por sítios que seriam ocupados pela Bax na membrana externa mitocondrial (Murphy et al, 2000).

Quando a concentração de Bax é superior à de Bcl-2, esta forma homodímeros e acelera o processo de apoptose, desde que haja um estímulo externo. Quando a Bcl-2 apresenta maior concentração, esta compete com a Bax, formando heterodímeros Bax-Bcl-2, o que retarda o processo de apoptose (Oltvai et al, 1993). A ação inibidora da apoptose atribuída ao Bcl-2 ocorre por meio da inibição da ação do Citocromo C na mitocôndria, evitando a cascata de eventos que resulta no comprometimento do potencial de membrana externo da mitocôndria que, em contrapartida, ativa a caspase 9 e, subsequentemente, a apoptose (Nadler et al, 2008). A **Apaf-1** é uma proteína pró-apoptótica envolvida na morte celular. Quando o Citocromo C é liberado da mitocôndria, interage com o Apaf-1 e o dATP para dar forma ao apoptosomo, um complexo grande da proteína que possa ativar caspase 9,

levando à apoptose (Amin et al, 2010).

Trocas cíclicas em modelo de apoptose durante o ciclo menstrual sugerem que a apoptose seja progesterona-dependente. Entretanto, não se evidenciou diferença no nível de progesterona entre mulheres com endometriose e sem endometriose. Nenhuma correlação foi encontrada entre a apoptose e o nível de progesterona, o que sugere outro mecanismo influenciando a apoptose (Szymanowski, 2007).

1.1.2 Apoptose e Endometriose

A hipótese de que a diminuição da apoptose na célula endometrial, ou imune do sistema reprodutivo, contribua para a patogênese da endometriose tem sido considerada e estudada por vários investigadores com resultados diversos (Harada et al, 1996; Mc Laren et al, 1997; Suganuma et al, 1997; Dmowski et al, 1998; Gebel et al, 1998; Jones et al, 1998; Matsumoto et al, 1999; Meresman et al, 2000).

No estudo de Jones et al (1998), não se detectou apoptose em célula estromal de tecido endometriótico peritoneal. De acordo com estes achados, a Bcl-2 se apresenta em grande escala em células estromais de tecido ectópico.

Várias evidências sugerem que a apoptose ajude a manter a homeostasia celular durante o ciclo menstrual, eliminando células envelhecidas da camada funcional do endométrio uterino, durante a fase secretora tardia (Harada et al, 2004).

A análise da expressão da proteína Bcl-2 por alguns autores mostrou que há menor expressão da proteína Bcl-2 no cisto de endometriose que na endometriose peritoneal (Harada et al, 1996; Suganuma et al, 1997; Nezhat, Kalir, 2002).

Células endometriais ectópicas obtidas de sítios da endometriose são sempre mais resistentes à apoptose e mais resistentes à citólise peritoneal mediada por macrófagos (Braun et al, 1992; Gebel et al, 1998).

O modelo cíclico da expressão da proteína Bcl-2 na célula glandular endometrial foi relatado para trocas nos receptores de estrógeno e progesterona durante o ciclo (Otsuki et al, 1994).

O exame da expressão da proteína Bcl-2 no endométrio eutópico e ectópico de pacientes com endometriose demonstra que a expressão desta proteína nas células endometriais de mulheres com endometriose tem um modelo cíclico. A mesma manifestação não foi evidenciada no tecido endometriótico ovariano e no peritoneal (Watanabe et al, 1997).

Analisando a expressão das proteínas Bcl-2 e Bax em tecido endometrial e em macrófagos de líquido peritoneal de pacientes com endometriose, observou-se que, em tecido endometrial tópico ou ectópico, a expressão da Bcl-2 acompanha o ciclo menstrual com aumento na fase proliferativa e declínio até níveis não mensuráveis na segunda metade da fase secretora, enquanto a expressão da proteína Bax não se altera, independentemente da fase do ciclo ou do tecido endometrial tópico ou ectópico. Observou-se, ainda, que macrófagos expressando a proteína Bcl-2 estavam presentes em número significativamente maior em pacientes com endometriose e apresentaram variação cíclica, com declínio de seu número alcançando valores próximos aos encontrados em pacientes sem endometriose na fase secretora do ciclo menstrual. Nestas pacientes, não houve variação cíclica desses macrófagos em relação aos macrófagos que expressavam proteína Bax. Um número expressivamente maior foi encontrado em pacientes sem endometriose,

comparado a pacientes com endometriose. Porém, em ambos os grupos, não houve alteração de número com a fase do ciclo (MacLaren et al, 1997).

No endométrio, a proteína Bcl-2 tem sua máxima expressão durante a fase proliferativa, gradualmente diminuindo até a fase secretora, quando praticamente não é encontrada, coincidindo com a observação de aumento na incidência de apoptose na fase secretora do ciclo menstrual e diminuição da apoptose na fase proliferativa do ciclo menstrual (Otsuki et al, 1994; Watanabe et al, 1997).

Neste contexto, Critchley et al (1999) reportaram um aumento na expressão da proteína Bcl-2 na glândula e no epitélio de endométrio tratado com antiprogestínico.

Quando células endometriais de mulheres com endometriose foram analisadas por Meresman et al (2000), eles observaram aumento da expressão da proteína Bcl-2 e diminuição da expressão da proteína Bax. Ainda o grupo de Meresman, em 2000, observou um aumento na expressão da proteína Bcl-2 no endométrio eutópico proliferativo de mulheres com endometriose, quando comparado com endométrio normal de mulheres obesas.

No mesmo estudo pôde-se avaliar a expressão da proteína Bax e observar sua ausência no endométrio proliferativo. Entretanto, houve um aumento em sua expressão no endométrio, na fase secretória, de mulheres com endometriose e obesas (Meresman et al, 2000).

Após vários trabalhos, observou-se que o modelo cíclico da expressão da proteína Bcl-2 não teve grande ocorrência após a administração de levonorgestrel, indicando que a constante administração de hormônio esteroide pode afetar a

expressão da Bcl-2 (Rogers et al, 2000). Adicionalmente se propôs que a ação antiproliferativa do análogo do GnRH poderia ser mediada por ativação do sistema Fas-Fasl e aumentar a morte celular apoptótica (Imai, Tamaya, 2000).

Evidências sugerem que a proliferação normal e a ciclicidade apoptótica do endométrio esteja descontrolada em mulheres com endometriose, ocorrendo redução da apoptose observada primariamente na fase proliferativa precoce e na fase secretora tardia do ciclo menstrual. E ainda, que há baixa expressão dos índices de apoptose em glândula endometrial de endométrio eutópico de mulheres com endometriose, especialmente durante a fase secretória tardia e proliferativa precoce do ciclo menstrual, comparado com mulheres sem endometriose. Isto pode indicar um aumento da viabilidade da célula endometrial regurgitada durante a menstruação, facilitando sua sobrevivência e implantação ectópica (Dmowski et al, 2001).

O endométrio eutópico de mulheres com endometriose tem fundamental diferença quando comparado com endométrio eutópico de mulheres sem endometriose. Isto inclui uma variedade de alterações na estrutura, proliferação, componente imune, enzimas proteolíticas e seus inibidores, hormônios produtores de citocinas, expressão dos genes e produção de proteínas (Sharpe –Timms et al, 2001). E, ainda, no endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose, as células apoptóticas e o número de macrófagos foram positivamente correlacionados. Entretanto, o número de células apoptóticas e de macrófagos contido no endométrio de mulheres com endometriose foi significativamente reduzido quando comparado ao controle saudável de mulheres sem endometriose. No mesmo estudo, foram relatadas diferenças entre a apoptose e o número de macrófagos observados nas

duas populações, em especial durante a fase proliferativa precoce do ciclo menstrual. Concluiu-se que os distúrbios fisiológicos na população de macrófagos no endométrio eutópico ocorrem em mulheres com endometriose. Este distúrbio é mais aparente durante a fase proliferativa precoce do ciclo menstrual (Braun et al, 2002).

Em se tratando do uso de medicação hormonal ou não, alguns pesquisadores sugerem que o esteroide ovariano possa controlar a apoptose endometrial por estímulo e supressão da expressão da Bcl-2 e Bax (Rotello et al, 1992; Koh et al, 1995; Tabibzadeh et al, 1995). Sugere-se, também, que o uso do análogo do GnRH no tratamento da endometriose induza a regressão dos implantes endometrióticos por meio da indução do hipoesrogenismo causado pela *down regulation* (Vignali, 1998); entretanto o efeito modulador direto do análogo do GnRH sobre o crescimento da endometriose tem sido observado (Borroni et al, 2000; Imai, Tamaya, 2000; Sica et al, 2001; Meresman et al, 2003). Acredita-se que o análogo do GnRH induza apoptose, tanto nas células endometriais tópicas, como nas ectópicas, de pacientes com endometriose (Imai, Tamaya, 2000; Meresman et al, 2003). Segundo estes autores, o análogo do GnRH aumenta a apoptose na célula epitelial endometrial, e isto é acompanhado por aumento na expressão dos fatores pró-apoptóticos Bax e FasL e diminuição da expressão do fator antiapoptótico proteína Bcl-2.

No estudo da redução da apoptose e da proliferação da endometriose, constatou-se que, quando o tecido endometrial tem uma localização ectópica, ele difere do endométrio eutópico pelo índice de proliferação, nível de hormônio esteroide e marcadores de apoptose. A redução da sensibilidade das células endometrióticas para a apoptose poderia promover a disseminação e implantação

dessas células em sítios ectópicos (Béliard et al, 2004). Segundo estes autores, não há diferença em apoptose espontânea entre endométrio de pacientes acometidas ou não pela doença. A implantação ectópica do endométrio não poderia ser atribuída à diminuição da apoptose no endométrio. Endométrio normal de pacientes sem endometriose tem, entretanto, a possibilidade de ser sede de implante de localização ectópica. Lesões endometrióticas apresentam um aumento na expressão da proteína Bcl-2 comparadas ao endométrio. Deste modo, uma elevada expressão da Bcl-2 promoveria a sobrevivência de tecido endometriótico no sítio ectópico (Béliard et al, 2004).

O endométrio eutópico de mulheres com endometriose apresenta alguma diferença fundamental quando comparado ao endométrio eutópico de mulheres sem endometriose. Esta diferença poderia contribuir para a sobrevivência das células endometriais regurgitadas dentro da cavidade peritoneal, permitindo desenvolver endometriose (Harada et al, 2004).

Alguns autores sugerem o envolvimento da apoptose na patogênese da endometriose. Entretanto, a expressão da proteína apoptótica relacionada varia de acordo com a localização da endometriose, sugerindo o envolvimento de diferentes caminhos apoptóticos. Evidenciou-se ação apoptótica em células endometriais típicas na endometriose ovariana e na endometriose peritoneal, mas raramente em endometriose colorretal (Dufournet et al, 2006).

O envolvimento de fatores genéticos, imunológicos e endócrinos pode contribuir para a patogênese da endometriose por alterar as características das células endometriais. A atividade das enzimas proteolíticas, o conteúdo dos diferentes receptores hormonais, a produção hormonal local, a supervisão do escape

imunológico, a diminuição da apoptose, a produção aberrante de citocinas, os fatores de crescimento e as proteínas específicas são as principais características do endométrio ectópico de mulheres com endometriose e acredita-se contribuir para a estabilidade e manutenção da doença. Entretanto, muitas diferenças observadas entre o endométrio ectópico e o endométrio eutópico de mulheres com endometriose podem ser explicadas por diferentes efeitos do fluido peritoneal e seu conteúdo (Ulukus et al, 2006).

A irregularidade da expressão dos genes reguladores pró e antiapoptóticos em células endometriais tópicas e eutópicas de mulheres com endometriose está evidente. Estes resultados sugerem certa resistência apoptótica e aumento da sobrevivência de células endometriais e endometrióticas (Braun et al, 2007). A apoptose induzida pelo análogo do GnRH na célula epitelial endometrial é mediada pelo modelo Bax/Bcl-2 (Bilotas et al, 2007).

Recentemente no estudo da relação endometriose e apoptose, alguns autores relataram como principal achado que a endometriose está associada com a ativação da transcrição do gene p53 e alterações no processamento alternativo do gene Bcl-x, causando um aumento do nível do fator pró-apoptótico Bcl xs. Os autores concluíram que a expressão do gene apoptótico avaliada no endométrio eutópico uterino está diminuída em mulheres com endometriose e este desequilíbrio pode ser relatado pela presença e gravidade da doença. Sugeriram, também, que anormalidades do gene p53, Bax, e da família Bcl-2, que estão envolvidos no controle da apoptose, podem exercer um papel na evolução da doença (Zubor et al, 2009).

A busca por modalidade adequada de tratamento medicamentoso despertou, nas últimas décadas, o interesse pelo estudo da biologia molecular do

endométrio tópico e da endometriose. O estudo do ciclo da vida das células endometriais tópicas e do tecido endometrial ectópico despertou o interesse de pesquisadores na busca por identificar a droga ideal para combater esta moléstia.

Decidimos realizar este trabalho para nos aprofundarmos no estudo da endometriose e, conseqüentemente, promovermos a melhor opção terapêutica para resolução dessa enfermidade; para isto, visualizamos a necessidade crescente de informações sobre os fatores apoptóticos na gênese da endometriose.

2. OBJETIVO

Avaliar a presença de fatores antiapoptóticos e pró-apoptóticos na endometriose pélvica e no endométrio normal.

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1 Casuística

Realizamos um estudo observacional transversal aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (Lista 1). No recrutamento, foram diagnosticadas e tratadas 170 pacientes com diagnóstico de endometriose pélvica. Dentre estas, foram selecionadas 40 pacientes portadoras de endometriose pélvica profunda, que satisfizeram nossos critérios de inclusão e exclusão (Anexo 6). As mesmas foram atendidas na Clínica de Endoscopia Ginecológica e Endometriose do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital Central da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e Hospital Santa Isabel, no período de 01 de outubro de 2007 a 31 de outubro de 2008.

As pacientes foram orientadas verbalmente e por meio de documento informativo específico quanto ao diagnóstico de endometriose pélvica profunda e convidadas a participar do estudo, concordando com o mesmo e assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1).

Todas as pacientes foram submetidas à videolaparoscopia cirúrgica e biópsia endometrial com cureta de Novak, realizadas pelo mesmo cirurgião, com obtenção de material do endométrio, peritônio, ligamento útero-sacro e intestino para análise anatomopatológica e confirmação da endometriose. Realizamos avaliação clínica e por imagem, para confirmação da hipótese diagnóstica de endometriose

profunda. A endometriose foi diagnosticada por visualização direta dos focos durante a laparoscopia e confirmada histologicamente.

O estadiamento da endometriose foi feito pela classificação revisada da *American Fertility Society* (ASRM -96). Todas as nossas pacientes apresentaram escore da ASRM superior a 40, sendo classificadas como estágio IV.

3.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

Incluímos em nosso estudo pacientes na menacme, com ciclos eumenorreicos, portadoras de endometriose pélvica profunda (EPP), que não haviam sido submetidas a tratamento medicamentoso hormonal, nem medicação anti-inflamatória pelo período mínimo de três meses antes de sua inclusão no estudo. Foram excluídas as pacientes que apresentavam algum tipo de doença crônica, neoplasia maligna e aquelas que faziam uso regular de medicamentos, hormônios e anti-inflamatórios.

3.1.2 Dados epidemiológicos

As pacientes estudadas encontravam-se entre 26 anos e 46 anos de idade, com média de 36,4 anos e desvio padrão de 4,9. Apresentavam índice de massa corpórea médio= 23,1.

3.2 Métodos

3.2.1 Análise histopatológica

Após fixação em solução de formaldeído tamponado a 10%, o material foi encaminhado ao Serviço de Anatomia Patológica da ISCMSP.

Realizou-se inicialmente a análise macroscópica dos espécimes, a seguir a desidratação 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 4 µm de espessura. Os cortes histológicos foram corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE) (Anexo 2) e foi realizada a leitura em microscópio óptico comum. Os casos foram avaliados por examinador experiente e os laudos emitidos de acordo com a padronização utilizada pela instituição (Abrao et al, 2003). Todos os casos apresentavam endometriose e foram selecionados para a confecção do arranjo tecidual em matriz, consagradamente conhecido como *tissue microarray* (TMA).

3.2.2 – *Tissue Microarray* (TMA)

A técnica de TMA (*Tissue Microarray*) utilizada no presente estudo foi realizada no Laboratório de Consultoria em Patologia Botucatu–São Paulo. Para tal, empregou-se a marcação do local na lâmina do tipo histológico a ser estudado e o local correspondente a esta marcação no bloco de parafina. Desta forma, obtivemos as áreas marcadas, visando à confecção do TMA, (Kononen et al, 1998; Packeisen et al, 2003, Rijn, Gilks, 2004; Gualco et al, 2008) e está descrita no Anexo 3.

3.2.3 - Estudo imunoistoquímico

Na análise da imunoistoquímica foram avaliadas as expressões dos seguintes anticorpos monoclonais, Bcl-2 e Ciclina D1, dos anticorpos policlonais Bax e Apaf-1. A técnica imunoistoquímica utilizada no presente estudo foi realizada no Serviço de Anatomia Patológica da ISCMSP, seguindo técnicas-padrão de nossa instituição (Anexo 4).

Os cortes foram incubados com os anticorpos primários preparados em solução previamente otimizada de Bcl-2, Ciclina D1, Bax e APAF. Para visualização da reação, os cortes foram tratados com substrato cromogênico (diaminobenzidina a 60 mg% em PBS associado a 1,5 ml de peróxido de hidrogênio a 20 volumes), por cinco minutos, a 37°C. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris, seguindo-se desidratação e montagem em *entellan* com lamínula.

A positividade da reação para identificação das células tumorais e os marcadores analisados foram sinalizados pela cor sépia (substrato cromogênico). Os anticorpos primários utilizados nas reações imunoistoquímicas foram: Bcl-2 (anticorpos monoclonais) clone 124 DAKO®, Bax (anticorpos policlonais) proteína sintética que corresponde ao aminoácido 43-61 DAKO® da proteína humana Bax; Ciclina D1 (anticorpos monoclonais) clone AM-29 e APAF -1 (anticorpos policlonais) peptídeo sintético derivado do C – terminus Apaf - 1 humano, nas diluições 1/200, 1/3.000, 1/650, 1/600, respectivamente.

A expressão do complexo antígeno-anticorpo determinou a presença de coloração sépia nas áreas de positividade, podendo ser nuclear, citoplasmática ou de membrana, a depender do marcador avaliado (Fig. 3.)

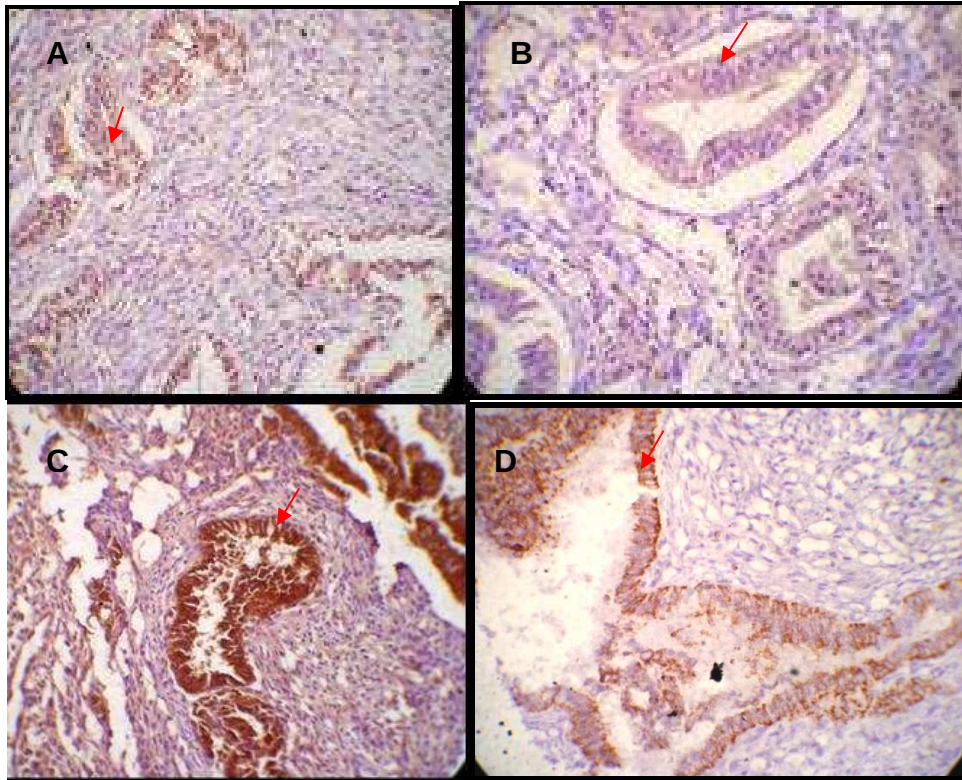


FIGURA 3. Endométrio AO 400 X - (Escore 3) - **A.** Imunomarcação Apaf1, **B.** Imunomarcação Bax, **C.** Imunomarcação Bcl-2, **D.** Imunomarcação Ciclina D1. Seta vermelha: Área de maior significância da imunomarcação.

Os critérios para classificarmos a expressão imunoistoquímica da Bcl-2, Ciclina D1; Bax, APAF-1 foram os mesmos utilizados para a determinação do escore do HER-2 de acordo com o HercepTesttm (Dako) que considerou escore 0 e 1 como negativo e escore 2 e 3, positivo (Tab. 1)(Farias et al, 2005).

TABELA 1. Escore utilizado para avaliação das expressões da Bcl-2, Ciclina D1, Bax e APAF-1.*HercepTesttm* (Dako)

Padrão de imunomarcção	Pontuação	Conclusão= Imunoexpressão
Ausência ou menos de 10% de Imunopositividade na membrana das células tumorais	0	Negativo
Imunopositividade fraca em parte da membrana em mais de 10% das células tumorais	1+	Negativo
Imunopositividade fraca a moderada em toda a membrana em mais de 10% das células tumorais	2+	Fracamente positivo
Imunopositividade intensa em toda a membrana em mais de 10% das células tumorais	3+	Fortemente positivo

Adaptado de Farias et al, 2005

3.2.4 – Avaliação semiquantitativa da imunomarcção por ROD (*Relative Optical Density*)

Após a avaliação imunoistoquímica dos fatores pró e antiapoptóticos, respectivamente (Bax e Apaf-1, Bcl-2 e Ciclina-D1), realizamos a análise semiquantitativa dos mesmos por densidade óptica relativa (ROD). Empregamos o sistema MCID de análise densitométrica digital (*InterFocus Imaging Ltd.*, Linton, England) (Anexo 5).

Dos cortes histológicos obtidos pelo TMA, foram feitas novas lâminas sem a coloração de fundo (hematoxilina) e submetidas à análise semiquantitativa pelo método ROD (*Relative Optical Density*). Procedemos à calibração do aparelho (Anexo 5), ajustando a intensidade da cor a partir de uma escala de cinza de densidade óptica com valores pré-estabelecidos. Instituímos como padrão a abertura da lente de 8 cm e altura de 32,9 cm e *flet field correction* de 895. Em seguida, a captura das imagens e sua posterior marcação.

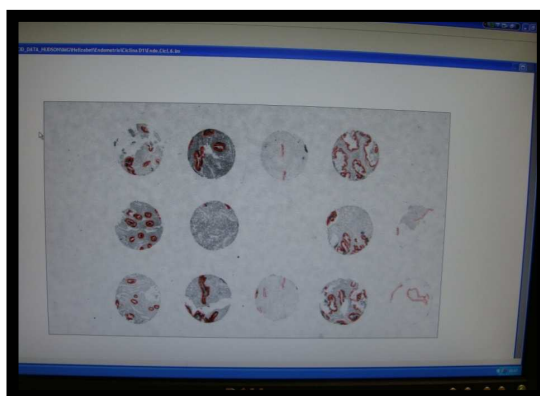
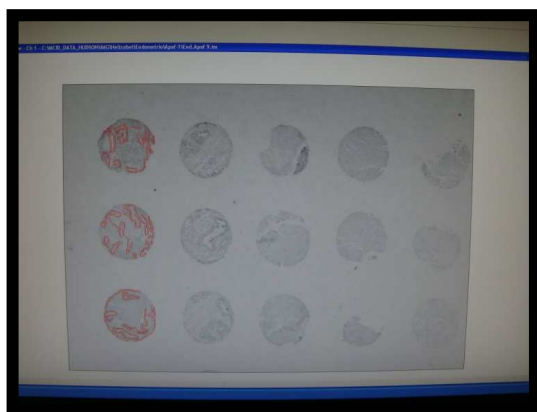
**FIGURA 4****FIGURA 5**

Imagem capturada (Fig. 4) e leitura (Fig. 5 -marcação em vermelho) das amostras do endométrio analisadas com Ciclina D1 das pacientes (DSS,ERR,APSRD,ELBP,MBA)

**FIGURA 6****FIGURA 7**

Leitura das amostras do endométrio das pacientes (EGS,VMCM) analisadas com Apaf-1

3.3. Análise Estatística

Para o cálculo do tamanho amostral utilizamos uma diferença estimada da porcentagem de expressão dos fatores estudados de 40%, erro alfa de 5% e poder maior que 90%.

Os resultados foram coletados e armazenados em planilhas específicas, utilizando o *software* SPSS® (*Statistical Package for Social Sciences*) 16.0 for Windows. Posteriormente, empregando a mesma ferramenta para tratamento estatístico, procedemos à análise descritiva dos dados encontrados e sua tabulação.

Para análise da idade e índice de massa corpórea, calculou-se a homogeneidade da distribuição dos dados (Teste de Kolmogorov-Smirnov), que evidenciou distribuição normal e, a seguir, sua média, desvio-padrão e intervalo de confiança (IC 95%).

Para a análise das variáveis estudadas (expressão imunoistoquímica da Bcl-2, Ciclina D1, Bax e APAF-1) em suas diferentes localizações, aplicamos o teste de Qui-quadrado/Teste exato de Fisher (leitura positiva/negativa) e o Teste Z para múltiplas variáveis (leitura empregando o escore), com o intuito de verificar possíveis diferenças entre os grupos estudados.

Utilizamos também o teste de ANOVA para a análise da variância.

Quando o ANOVA foi significativo, fez-se o uso das comparações múltiplas de Tukey.

Fixamos 5% como nível de rejeição da hipótese de nulidade para todos os parâmetros por nós avaliados.

4. RESULTADOS

Inicialmente apresentamos a análise qualitativa da frequência da imunoexpressão da proteína Bcl-2 em todos os locais por nós avaliados: Endométrio, peritônio, ligamento útero sacro e intestino.

Observamos que a análise da frequência da imunoexpressão da proteína Bcl-2 no endométrio, obteve escore 1 em cinco pacientes (12,5%), escore 2 em dezessete pacientes 17 (42,5%) e escore 3 em dezoito pacientes (45%). Analisando o peritônio observamos escore 2 em vinte e oito pacientes (70%) e escore 3 em doze pacientes (30%).

A análise da frequência da imunoexpressão da proteína Bcl-2 no ligamento útero-sacro mostrou escore 1 em uma paciente (2,5%), escore 2 em trinta e duas pacientes (80%) e escore 3 em sete pacientes (17,5%). A análise no intestino foi: escore 2 em vinte e nove pacientes (72,5%) e escore 3 em onze pacientes (27,5%) (Fig. 8).

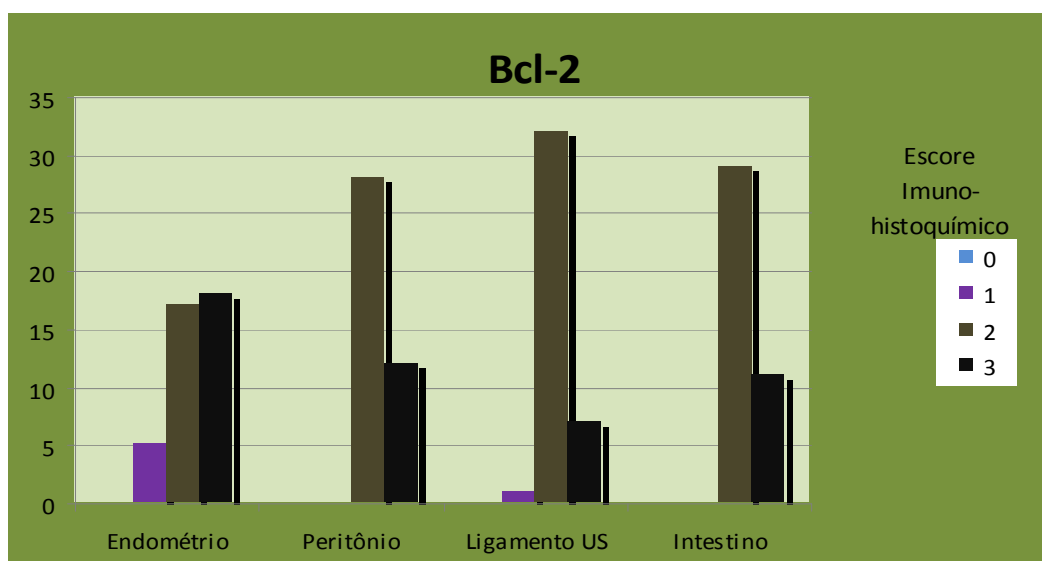


FIGURA 8 - Representação do escore imunoistoquímico da proteína Bcl-2 no endométrio e em fragmentos de tecidos de mulheres portadoras de endometriose pélvica .

Seguimos com a análise qualitativa da frequência da imunexpressão da proteína Ciclina D1 em todos os locais por nós avaliados.

No endométrio, a imunexpressão da Ciclina D1 obteve escore 1 em dez pacientes (25%), escore 2 em vinte e duas pacientes 22 (55%), e escore 3 em oito pacientes 8 (20%). No peritônio obtivemos escore 0 em doze pacientes (30%), escore 1 em dezessete pacientes (42,5%) e escore 2 em onze pacientes (27,5%). Já o ligamento útero-sacro mostrou escore 1 em trinta e cinco pacientes (87,5%), escore 2 em cinco pacientes (12,5%). E no intestino: escore 1 onze 11 pacientes (27,5%) escore 2 de vinte e dois (55%), escore 3 de sete pacientes (17,5%).

O escore mediano da expressão da Ciclina D1 no endométrio foi 2, no peritônio e ligamento útero-sacro 1 e no intestino 2, não havendo diferença entre

a expressão de Ciclina D1 no endométrio e nas outras localizações (Fig. 9).

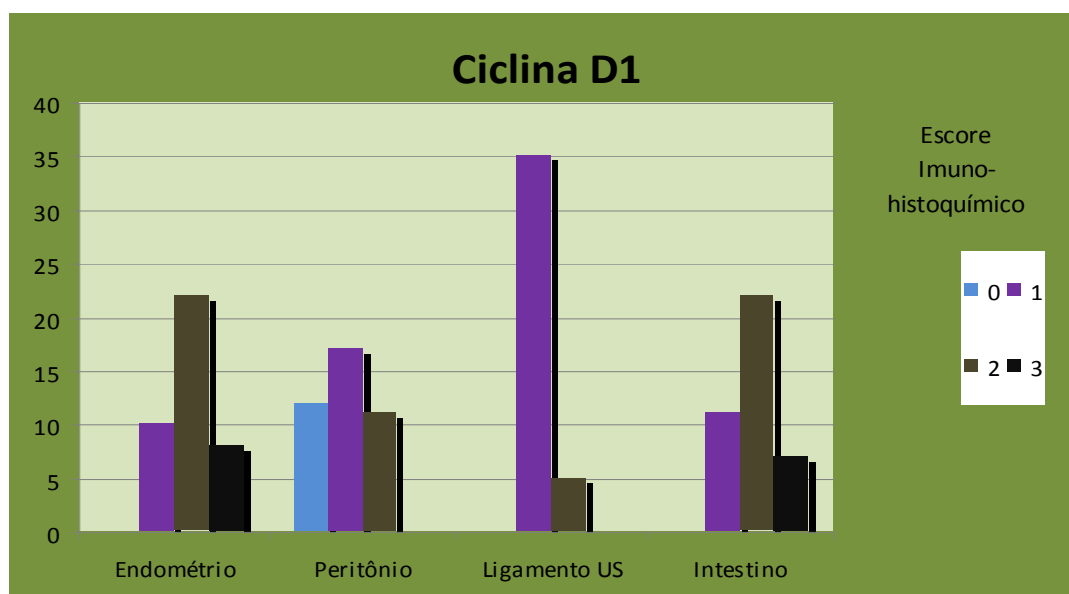


FIGURA 9 - Representação do escore imunoistoquímico da proteína Ciclina D1 no endométrio e em fragmentos de tecidos de mulheres portadoras de endometriose pélvica.

A análise qualitativa da frequência da imunoexpressão da proteína pró-apoptótica Bax no endométrio mostrou escore 0 em trinta pacientes (75%) e escore 1 em dez pacientes (25%). Já no peritônio observamos escore 0 em todas as pacientes (100%). No ligamento útero-sacro escore 0 em vinte e nove pacientes (72,5%), escore 1 em dez pacientes (25%) e escore 2 em apenas 1 paciente (2,5%). Já o intestino mostrou escore 0 em 35 pacientes (87,5%) e escore 1 em 5 pacientes (12,5%).

A mediana do escore da expressão da Bax no endométrio, peritônio, ligamento útero-sacro e intestino foi zero (0), não havendo diferença estatística entre a expressão da Bax no endométrio e nas outras localizações (Fig.10).

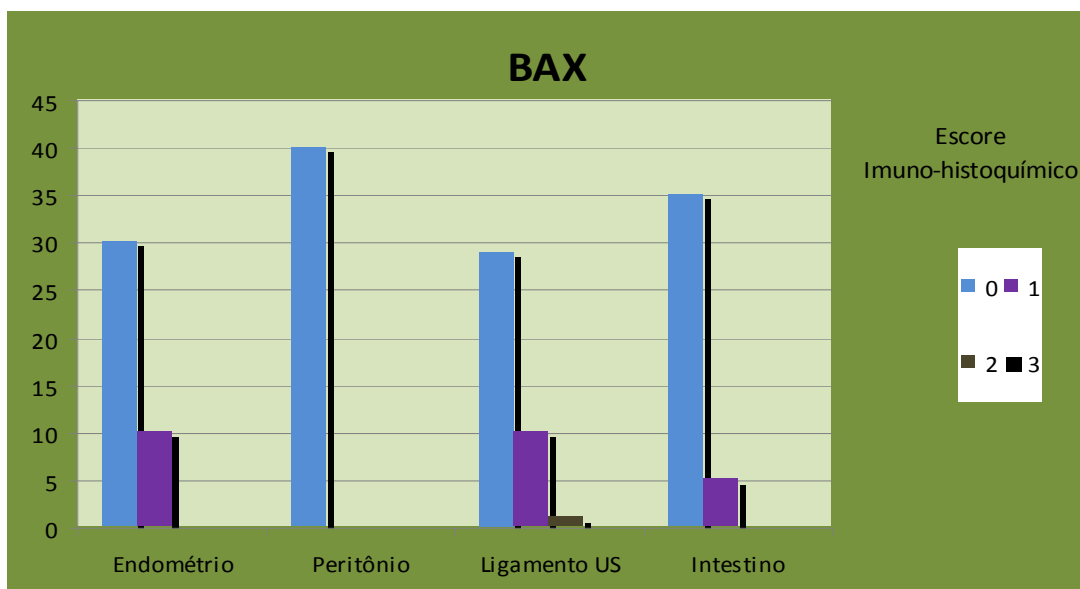


FIGURA 10 - Representação do escore imunoistoquímico da proteína Bax no endométrio e em fragmentos de tecidos de mulheres portadoras de endometriose pélvica.

E finalmente, analisando a proteína pró-apoptótica Apaf-1, observamos que no endométrio o escore 0 ocorreu em 22 pacientes (55%), o escore 1 em dezoito pacientes (45%). Já no peritônio o escore 0 se deu em nove pacientes (22,5%), escore 1 em dezoito (45%) e escore 2 em treze pacientes (32,5%). No ligamento útero-sacro: escore 0 em dezessete pacientes (42,5%), escore 1 em 15 pacientes (37,5%), escore 2 em 7 pacientes (17,5%) e escore 3 em uma paciente (2,5%). E no Intestino: escore 0 em dez pacientes (25%), escore 1 quatorze (35%) e escore 2- dezesseis (40%).

O escore mediano da expressão da Apaf-1 no endométrio foi zero (0) no peritônio e ligamento útero-sacro, e no intestino foi 2. O teste estatístico não

evidenciou diferença entre a expressão da Apaf-1 no endométrio, em comparação com o peritônio, ligamento útero-sacro e intestino (Fig. 11).

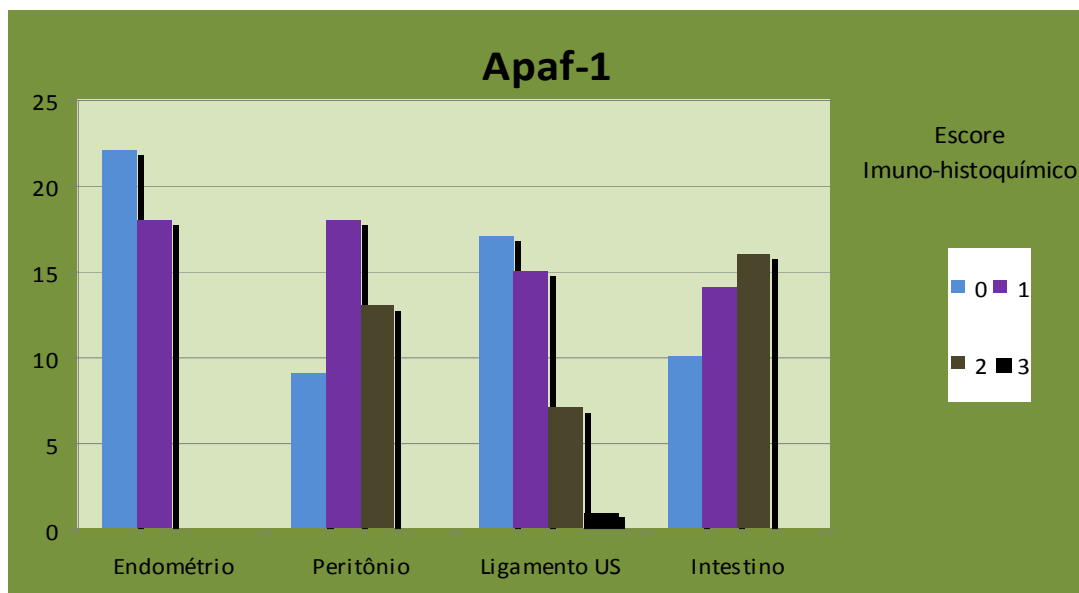


FIGURA 11 - Representação do escore imunoistoquímico da proteína Apaf-1 no endométrio e em fragmentos de tecidos de mulheres portadoras de endometriose pélvica .

Os dados relativos à expressão das proteínas Bcl-2, Ciclina D1, BAX e Apaf-1 no endométrio são apresentados na Tabela 2. Ressalta-se que a análise estatística por meio do teste do Qui-quadrado e do Teste exato de Fischer não demonstrou diferença significativa.

TABELA 2 - Análise da expressão dos fatores antiapoptóticos e pró-apoptóticos no endométrio de mulheres portadoras de endometriose pélvica (Santa Casa de São Paulo - 2010)

Escore Endométrio	Bcl-2	Ciclina D1	BAX	Apaf-1
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
0	-	-	30 (75%)	22 (55%)
1	5 (12,5%)	10 (25%)	10 (25%)	18 (45%)
2	17 (42,5%)	22 (55%)	-	-
3	18 (45%)	08 (20%)	-	-
Total	40 (100%)	40 (100%)	40 (100%)	40 (100%)

Na tabela 3 pode-se verificar a análise descritiva dos dados relativos à expressão dos fatores estudados no peritônio. A análise estatística por meio do teste do Qui-quadrado e do Teste exato de Fischer não demonstrou diferença significativa.

TABELA 3 - Análise da expressão dos fatores antiapoptóticos e pró-apoptóticos no peritônio de mulheres portadoras de endometriose pélvica (Santa Casa de São Paulo - 2010)

Escore Peritônio	Bcl-2	Ciclina D1	BAX	Apaf-1
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
0	-	12 (30%)	40 (100%)	09 (22,5%)
1	-	17 (42,5%)	-	18 (45%)
2	28 (70%)	11 (27,5%)	-	13 (32,5%)
3	12 (30%)	-	-	-
Total	40 (100%)	40 (100%)	40 (100%)	40 (100%)

Estudando os fragmentos de ligamento útero-sacro de mulheres portadoras de endometriose observou-se maior expressão da Ciclina D1 em comparação à BAX e à Apaf-1, entendemos que não houve escore 0 na Ciclina D1 (Tab. 4).

TABELA 4 - Análise da expressão dos fatores antiapoptóticos e pró-apoptóticos no ligamento útero-sacro de mulheres portadoras de endometriose pélvica (Santa Casa de São Paulo –2010)

Escore Lig US	Bcl-2	Ciclina D1	BAX	Apaf-1
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
0	-	-	29 (72,5%) §	17 (42,5%) ¥
1	1 (2,5%)	35 (87,5%)	10 (25%)	15 (37,5%)
2	32 (80%)	5 (12,5%)	01 (2,5%)	07 (17,5%)
3	07 (17,5%)	-	-	01 (2,5%)
Total	40 (100%)	40 (100%)	40 (100%)	40 (100%)

¥ - Ciclina D1 x Apaf-1. Teste exato de Fisher p=0,03

§ - Ciclina D1 x BAX. Teste exato de Fisher p=0,0

A expressão imunoistoquímica da Ciclina D1 no intestino de mulheres portadoras de endometriose foi significativamente maior que a expressão da Apaf-1 nos mesmos fragmentos (Tab. 5). Observamos que houve significância entre a Ciclina D1, que mostrou 72,5% de escore 2 e 3 , quando comparada à Apaf-1 com 25% de escore 0, quando foi avaliado fragmento intestinal (Tab. 5).

TABELA 5 - Análise da expressão dos fatores antiapoptóticos e pró-apoptóticos no intestino de mulheres portadoras de endometriose pélvica (Santa Casa de São Paulo - 2010)

Escore Intestino	Bcl-2	Ciclina D1	BAX	Apaf-1
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
0	-	-	35 (87,5%)	10 (25%) §
1	-	11 (27,5%)	05 (12,5%)	14 (35%)
2	29 (72,5%)	22 (55%)	-	16 (40%)
3	11 (27,5%)	07 (17,5%)	-	-
Total	40 (100%)	40 (100%)	40 (100%)	40 (100%)

§ - Ciclina D1 x Apaf-1. Teste exato de Fisher p=0,02

A seguir, apresentaremos os nossos resultados semiquantitativos por meio da análise da densidade óptica relativa. Observamos (Tab. 6) a imunoexpressão de todos os fatores estudados nos locais avaliados e seu aumento no intestino; da mesma forma, houve a diminuição destes fatores no ligamento útero-sacro, quando os comparamos ao endométrio.

TABELA 6 - Análise da densidade ótica relativa (ROD) da Bcl-2, Ciclina D1, Bax e Apaf-1 no endométrio, peritônio, LUS e intestino de mulheres portadoras de endometriose pélvica (Santa Casa de São Paulo - 2010)

Local da biópsia	Bcl-2 (Média± Erro-padrão(IC95%))	Ciclina D1 (Média± Erro-padrão(IC95%))	Bax (Média± Erro-padrão(IC95%))	Apaf-1 (Média±Erro Padrão(IC 95%))
Endométrio	0,129/± 0,001 (0,127 - 0,132)	0,174/±0,001(0,172-0,176)	0,151/±0,001(0,149-0,153)	0,149/ ±0,001 (0,147-0,150))
Peritônio	0,116/±0,002(0,113-0,119)¥	0,126/±0,002(0,122-0,130)¥	0,143/±0,002(0,139-0,147) ¥	0,154/±0,002(0,151-0,158))¥
LUS	0,117/±0,001(0,114-0,119)¥	0,122/±0,001(0,119-0,124)¥	0,128±0,001(0,126-0,131) ¥	0,114/±0,001(0,112-0,116))¥
Intestino	0,141/±0,002(0,136-0,146))¥	0,127/±0,001(O,125-0,129)	0,166/±0,002(0,162-0,169) ¥	0,144/±0,002(0,140-0,149))¥

¥ Teste estatístico de Anova/Tukey, P,< 0,001 na comparação com o endométrio

Os dados expostos acima estão mais ilustrados neste gráfico, onde observamos, além do já exposto, um aumento na proteína Apaf-1 no peritônio, quando comparado ao endométrio.

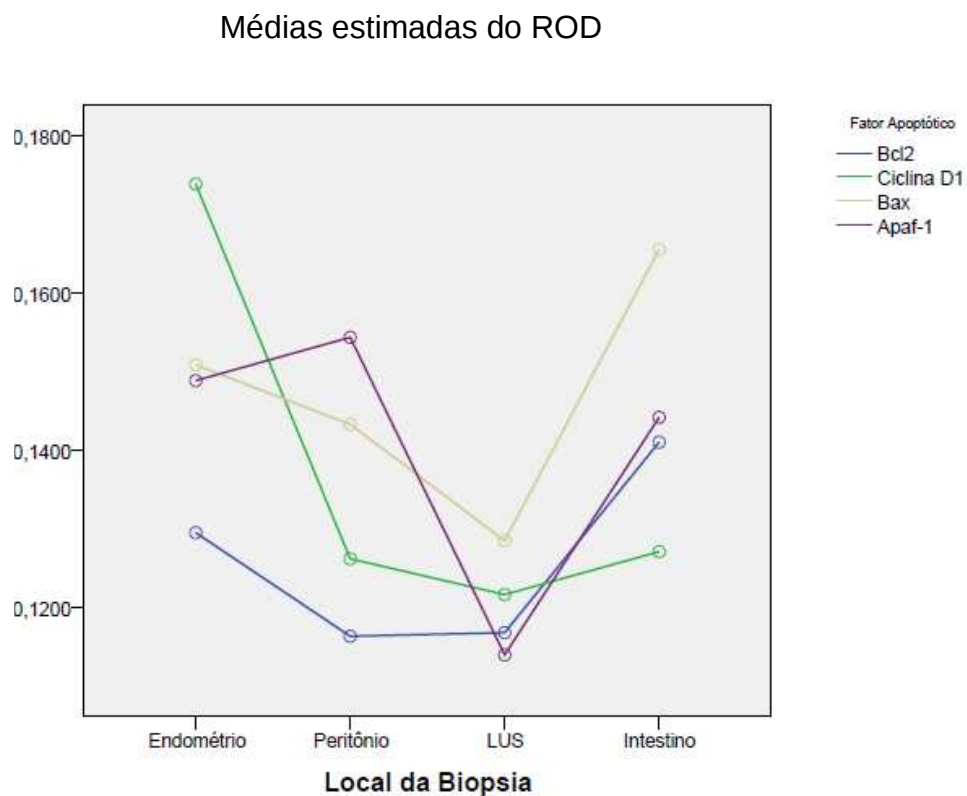


FIGURA 12- Representação gráfica da análise da densidade ótica relativa (ROD) das Bcl-2, Ciclina D1, Bax e Apaf-1 no endométrio, peritônio, LUS e intestino de mulheres portadoras de endometriose pélvica

5. DISCUSSÃO

A endometriose, doença enigmática de difícil diagnóstico e tratamento, foi motivo de nosso estudo e empenho neste trabalho. Para melhor entendimento de sua fisiopatologia, buscamos estudar a interferência dos fatores apoptóticos na gênese da endometriose. Destes fatores, analisamos os antiapoptóticos, Bcl-2 e Ciclina D1, e os pró-apoptóticos, Bax e Apaf-1.

Para isto, inicialmente utilizamos a análise histopatológica dos seguimentos por nós avaliados: endométrio, peritônio, ligamento útero-sacro e intestino. Na sequência, optamos pelo emprego da técnica do TMA (*Tissue Micro Arayer*), que constitui metodologia eficiente, proposta para determinar a expressão de proteínas ou genes por meio da junção de vários espécimes de tecido em uma única lâmina de microscópio, sendo, portanto, eficaz e econômica. Esta técnica permite a homogeneização das reações imunoistoquímicas, diminui vieses resultantes desses processos e aperfeiçoa a execução do estudo por permitir a inclusão de múltiplos casos em um único bloco.

Outra vantagem da técnica é que cada espécime é tratado de maneira idêntica ao outro; conseqüentemente, a quantidade dos reagentes, o período de incubação e a temperatura são iguais em toda a lâmina, portanto os resultados de sua coloração são perfeitamente comparáveis. (Battifora, 1986; Chen, Foran 2006; Hassan et al, 2008).

Cabe assinalar que são reconhecidas como desvantagens do TMA a significativa heterogeneidade entre as células tumorais e, dentro dos tecidos, a necessidade do emprego de padrão técnico adequado que permita a obtenção de células puras, como também a necessidade de repetição nos casos negativos quando a quantidade de tumor for pequena (Lakhani, Ashworth, 2001; Sapino et al, 2006).

Em nosso estudo, objetivamos realizar os blocos de TMA com mínima perda tecidual ou defeitos técnicos que prejudicassem a confecção e leitura das lâminas. Para isto, a distribuição do material de cada paciente foi feita em triplicata em cada bloco e em três blocos diferentes. Salientamos que obtivemos a confirmação de endometriose na totalidade dos casos estudados.

Após a realização da técnica do TMA, seguimos na investigação com a técnica imunoistoquímica, em que lâminas foram confeccionadas com a coloração de hematoxilina/eosina e os anticorpos monoclonais Bcl-2 e Ciclina D1 e anticorpos policlonais Bax e Apaf-1 foram testados. Empregamos a leitura do escore pelo *Hercep Testtm* (Dako) e obtivemos resultados qualitativos.

Após a análise destes resultados, sentimos a necessidade de usar um método semiquantitativo, portanto aplicamos a densidade óptica relativa, *Relative Optical Density* (ROD). Assim, empregando método estatístico adequado, obtivemos resultados semiquantitativos que validaram ainda mais nosso estudo. A partir desse momento, pudemos comparar nossos resultados com a literatura já consagrada.

A apoptose é uma distinta forma de morte celular programada (Kerr et al, 1972) e sua avaliação no endométrio tópico e eutópico de mulheres com

endometriose vem ganhando interesse (Harada et al, 2007). Várias evidências sugerem que a apoptose ajuda a manter a homeostasia celular durante o ciclo menstrual, eliminando as células remanescentes da camada funcional do endométrio durante a fase secretória tardia e a fase menstrual (Kokawa et al, 1996).

Atualmente estuda-se a existência de relação entre fatores antiapoptóticos e pró-apoptóticos na gênese da endometriose. Por isso buscamos desenvolver nosso trabalho, avaliando a possível relação entre os fatores antiapoptóticos (Bcl-2 e Ciclina D1) e pró-apoptóticos (Bax e Apaf-1) em diferentes localizações, e no endométrio de mulheres que desenvolveram endometriose pélvica e com comprometimento intestinal.

Os genes reguladores pró e antiapoptóticos se comportam de maneira irregular em células endometriais eutópicas e ectópicas de mulheres com endometriose. Estes resultados são consistentes com resistência apoptótica e aumento da sobrevivência de células endometriais em endometriose (Braun et al, 2007).

Em nosso estudo imunoistoquímico encontramos a presença do fator antiapoptótico (Bcl-2) e a ausência do fator pró-apoptótico (Bax) no tecido endometrial ectópico, de forma semelhante aos achados de Meresman et al, 2000, e Braun et al, em 2007. Estes achados nos fazem pensar que a expressão de proteína Bcl-2 e a ausência de proteína Bax poderia conferir a estas células a diminuição da susceptibilidade para apoptose, aumentando-lhes a expectativa de vida.

Várias alterações qualitativas e semiquantitativas relacionadas à expressão da apoptose foram observadas no peritônio, ovário e na endometriose colorretal. MacLaren et al, 1997, constataram que a proteína Bax não se altera,

independentemente da fase do ciclo ou do tecido endometrial tópico ou ectópico. Ao analisarem a expressão da proteína Bcl-2 em tecido endometrial tópico ou ectópico, constataram que a expressão da Bcl-2 acompanha o ciclo menstrual, com aumento na fase proliferativa e declínio até níveis não mensuráveis na segunda metade da fase secretora. Em nosso estudo, por meio do escore imunoistoquímico, constatamos que no endométrio a Bax tem escore 0 em 75% das pacientes e escore 1 em 25% das pacientes. No ligamento útero-sacro, cursa de forma semelhante, sendo 72,5% de escore 0 e 25% de escore 1, com a ressalva de que encontramos 2,5% de escore 2. No peritônio, constatamos que não há expressão da proteína Bax, com 100% de escore 0, e o intestino apresenta 87,5% de escore 0 e 12,5% de escore 1. Quando analisamos os nossos resultados pela densidade óptica relativa, observamos um aumento da densidade óptica da proteína Bax no endométrio, peritônio e intestino, e uma acentuada diminuição no ligamento útero-sacro. Nós avaliamos as nossas pacientes na fase secretora do ciclo menstrual e observamos pelo escore imunoistoquímico que a imunoexpressão da proteína Bcl-2 no endométrio obteve escore 1 em 12,5%, escore 2 em 42,5% e escore 3 em 45% das pacientes. Quando analisamos nossos resultados pelo ROD, constatamos que a proteína Bcl-2 está aumentada no endométrio e intestino.

A literatura relata baixa expressão dos índices de apoptose em mulheres com endometriose, na fase secretora tardia e proliferativa precoce do ciclo menstrual, podendo levar a um aumento de células endometriais viáveis regurgitadas na cavidade pélvica durante a menstruação, facilitando sua sobrevivência e implantação ectópica. É bastante provável que a apoptose seja somente um dos mecanismos que controle o desenvolvimento e a progressão da

endometriose. O balanço entre estes dois eventos pode determinar a progressão ou a regressão espontânea da doença e, ainda, explicar a existência de endometriose microscópica (Dmowski et al, 2001). Nosso estudo aponta, pelo escore imunoistoquímico, dados semelhantes aos relatados pelos autores acima em que os fatores pró-apoptóticos Bax e Apaf-1 apresentam respectivamente 75% e 55% de escore 0 no endométrio, sendo que a proteína Bax apresenta 100% de escore 0 no peritônio. Pela análise da densidade óptica relativa (ROD), a proteína Bax e a proteína Apaf-1 encontram-se aumentada no endométrio, peritônio e intestino. Ainda, analisando os fatores antiapoptóticos Bcl-2 e Ciclina D1, pelo escore imunoistoquímico, obtivemos 87,5% de escore 2 e 3, e 75% de escore 2 e 3, respectivamente. Pela análise da densidade óptica relativa (ROD), observamos um aumento da proteína Bcl-2 e da Ciclina D1 no endométrio e intestino. Devemos ressaltar que as mulheres de nosso estudo encontravam-se na fase secretora e proliferativa tardia do ciclo menstrual.

No estudo de Szymanowski K, 2007, ele relata que o índice de apoptose no endométrio eutópico de mulheres com endometriose foi baixo comparado ao de mulheres sem endometriose. As trocas cíclicas em apoptose durante o ciclo menstrual sugerem que a apoptose seja progesterona-dependente. Entretanto, não foi encontrada, por parte dos autores, nenhuma diferença no nível de progesterona entre mulheres com e sem endometriose. Nenhuma correlação foi encontrada entre apoptose e nível de progesterona, o que sugere a existência de outro mecanismo influenciando a apoptose. Nós poderíamos pensar em uma capacidade diminuída dos macrófagos em realizar a fagocitose das células endometriais em mulheres com endometriose, mantendo a sobrevivência destas células e da doença. Poderíamos

pensar também no fato de pacientes com endometriose terem maior susceptibilidade e persistência do fator antiapoptótico. Várias hipóteses podem estar certas e necessitamos de contínuo estudo sobre a doença. O processo que culmina com a implantação e sobrevivência de células endometriais na cavidade peritoneal, as alterações na expressão de genes específicos e de proteínas, o aumento na produção de esteroides e de citocinas tem sido identificado no endométrio eutópico de mulheres com endometriose. Considera-se, ainda, que o endométrio eutópico de mulheres com endometriose mostra diferenças fundamentais quando comparado ao endométrio normal de mulheres sem endometriose. Estas diferenças poderiam contribuir para a manutenção de células endometriais que são regurgitadas na cavidade peritoneal e consequente desenvolvimento da endometriose (Hassa et al, 2009).

Por meio de nossos resultados observamos que, no endométrio e peritônio de mulheres com endometriose, a expressão da Bcl-2, Ciclina D1, Bax e Apaf-1 não mostrou diferença significativa; entretanto, quando realizamos a análise da frequência destes fatores no endométrio, observamos 87,5% de escore 2 e 3 para a Bcl-2, e 75% de escore 2 e 3 para Ciclina D1, enquanto Bax e Apaf-1 não obtiveram escore 2 e 3. Avaliando estes fatores no peritônio, obtivemos 100% de escore 2 e 3 para a Bcl-2 e 100% de escore 0 para Bax, confirmando o exposto anteriormente. Em relação à análise destes fatores no ligamento útero-sacro, observamos que houve diferença significativa entre Ciclina D1 que não apresentou escore 0 e a Bax, que apresentou 72,5% de escore 0. Houve diferença significativa também entre a Ciclina D1 que apresentou 12,5% de escore 2 e a Apaf-1 que apresentou 42,5% de escore 0. Ainda analisando os mesmos fatores no intestino, constatamos que houve

diferença significativa entre a Ciclina D1 com 72,5% de escore 2 e 3 e a Apaf-1 que obteve 25% de escore 0. Analisando os nossos resultados pelo método semiquantitativo, observamos que todos os fatores estudados, Bcl-2, Ciclina D1, Bax e Apaf-1, quando comparados ao endométrio, estavam aumentados no intestino e diminuídos no ligamento útero-sacro, e que Bcl-2 e Ciclina D1 estavam diminuídas no peritônio quando comparados ao endométrio.

A análise de nossos resultados obtidos por meio do ROD, evidencia de forma gráfica (Fig. 12), a nítida mudança na expressão dos diversos fatores estudados quando comparamos o endométrio com todas as outras localizações.

É nítida também a diferença na expressão dos fatores antiapoptóticos e pró-apoptóticos, no peritônio e na endometriose profunda de ligamento útero-sacro e intestino. Nossos dados sustentam a hipótese de que à medida que a endometriose evoluiu infiltrando os tecidos em profundidade, as células perderiam a capacidade de controle deste processo complexo de morte celular programada. O aumento significativo da densidade óptica relativa de todos os fatores estudados no intestino, quando comparado às outras localizações, não só reforça esta tese, como demonstra o comportamento agressivo da doença nesta localização.

Todo este estudo nos faz pensar que podem existir mulheres com susceptibilidade aumentada para a manutenção dos fatores antiapoptóticos, ou deficiência imunológica e consequente diminuição da função dos macrófagos e, assim, persistência da doença. Estamos certos de que vários estudos são necessários para conquistar o seguimento ideal até a cura da doença em estádios mais avançados e diminuir a possibilidade de recidiva.

Podemos observar que após a avaliação da associação entre endometriose e apoptose, e a análise de alguns fatores antiapoptóticos e pró-apoptóticos, obtivemos resultados expressivos que certamente contribuirão para melhor compreensão e tratamento da endometriose.

6. CONCLUSÕES

1- Os fatores antiapoptóticos Bcl-2 e Ciclina D1 apresentam expressão no endométrio e nos fragmentos de tecido endometriótico estudado.

2- O fator pró-apoptótico Bax apresenta expressão praticamente nula, e o fator pró-apoptótico Apaf -1 apresenta expressão variável em todos os tecidos estudados.

3- O fator antiapoptótico Bcl-2 apresenta maior expressão no ligamento útero-sacro que no endométrio.

4- A expressão da Ciclina D1 nos fragmentos de ligamento útero-sacro foi superior à expressão da Bax e Apaf – 1.

5- A expressão da Ciclina D1 nos fragmentos de intestino foi superior à expressão da Apaf-1.

6- Há diferença na densidade óptica relativa de todos os fatores estudados, quando comparamos endométrio e peritônio, ligamento útero-sacro e intestino.

7. ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Participação da senhora paciente no estudo “Análise dos fatores anti apoptótico e pró apoptótico na endometriose pélvica e no endométrio normal”

Senhora paciente

Estamos realizando uma pesquisa médica para melhorar o diagnóstico e o tratamento da doença que a senhora possui (endometriose). Por isso gostaríamos de convidá-la a participar desta pesquisa, nos autorizando a usar os resultados dos seus exames que faremos aqui na Santa Casa.

A maioria dos exames são feitos normalmente para todas as mulheres que têm essa doença e são:

- . Ultrassonografia pélvica-transvaginal, um exame que estuda a sua barriga e transforma isto numa imagem de televisão.
- . Ressonância Magnética que é um exame parecido com o raio-x, só que um pouco mais demorado, porque tira várias chapas e nos mostra mais detalhes, facilitando perceber quando existem alterações e onde elas estão.
- . Ultrassonografia endoscópico transretal, um exame de ultrassonografia realizado pelo ânus e com a utilização de uma medicação calmante administrada na veia.

Após a realização destes exames poderemos realizar uma cirurgia, a laparoscopia, com muito mais segurança.

Durante a videolaparoscopia iremos retirar a maior quantidade possível de tecido (“pele”) da endometriose para aumentar sua chance de cura. Estes pedaços de tecidos serão encaminhados ao laboratório para realizar o exame anatomo-patológico que é o exame que confirma se é endometriose.

Realizaremos também a dosagem de alguns anticorpos e proteínas nestes pequenos pedaços de tecido tentando encontrar algumas substâncias que possam facilitar, ou dificultar, o desenvolvimento da doença. Para conhecer melhor a endometriose é importante também comparar os resultados das “dosagens” feitas nos pedaços de tecido de endometriose com o endométrio (“pele” que reveste o interior de seu útero). Para isto realizaremos também durante a laparoscopia uma pequena biópsia do interior do seu útero.

Se a senhora tiver qualquer dúvida sobre os exames, ou sobre a pesquisa, ou ainda sobre a doença, não se envergonhe faça qualquer pergunta, que teremos prazer em responder.

Caso a senhora queira deixar de participar da pesquisa, por qualquer que seja o motivo, poderá fazê-lo a qualquer momento e isto não mudará o atendimento nem seu tratamento. O seu nome, endereço, telefone e outros dados pessoais não serão contados para ninguém. Iremos usar só os resultados dos seus exames para a pesquisa. Estes resultados serão também fornecidos para a senhora a qualquer momento em que a senhora solicitar.

Se durante a pesquisa, alguma coisa relacionada a ela acontecer com a senhora, a Santa Casa dará toda ajuda médica que precisar.

Sabendo todas informações, eu, _____,
RG. _____, concordo em participar do estudo **“Análise dos fatores antiapoptótico, e pró apoptótico na endometriose pélvica e no endométrio normal”**e fazer os exames Ultra-som Pélvico-Transvaginal, Ressonância Nuclear Magnética, Ultra-som Endoscópico Transretal e Exame anátomo-patológico, através da videolaparoscopia.

Assinatura da paciente voluntária

Eu estou ciente e afirmo que expliquei todos os passos acima, bem como os riscos e benefícios da participação da pesquisa.

Assinatura do pesquisador
Helizabet Salomão Abdalla Ayroza Ribeiro –
21767000/ R 5535 / 21767794

São Paulo, ____/____/____.

ANEXO 2
FIGURAS DA COLORAÇÃO HEMATOXILINA /EOSINA

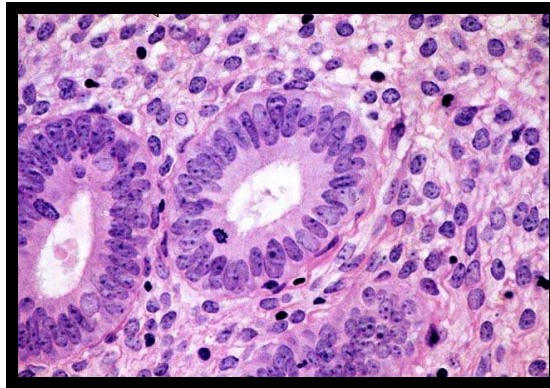


FIGURA 1
Endométrio Proliferativo tardio(MSPC)
HE 200X

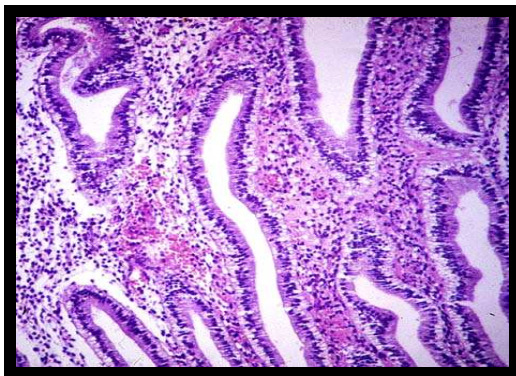


FIGURA 2
Endométrio Secretor(AVFN)
HE 200X

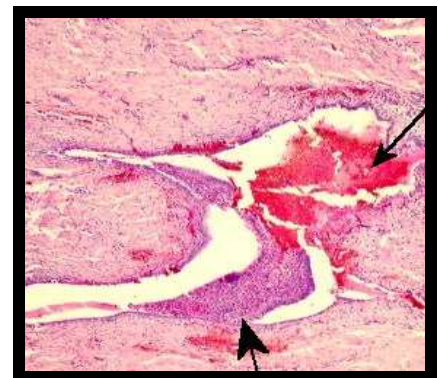


FIGURA 3
Ligamento Útero-Sacro(MSPC)
HE 200X

ANEXO 3

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA DE TMA

A construção do bloco de TMA seguiu a técnica de Kononen U, 1998.

1. Separação dos blocos de parafina para a realização dos TMAs, com *slots* de 0,6mm em triplicata, perfazendo um total de 12 blocos de TMA (Fig. 2); cada TMA com as amostras de um dos sítios (endométrio, LUS, peritônio, intestino) previamente marcados (blocos doadores) e descritos acima, correspondentes às áreas de interesse ao estudo imunoistoquímico. (Anexo 4)
2. Utilização do aparelho (*Beecher Instruments*, Sun Prairie, WI) para criar espaço vazado (“casela”) no bloco receptor;
3. Extração, do bloco doador, de um cilindro tecidual de 0,6 mm de diâmetro da respectiva área de interesse previamente selecionada;
4. Transferência do cilindro tecidual obtido do bloco doador para a “casela” previamente criada no bloco receptor com agulha de 1,0 mm;
5. Progressão, em frações de milímetros, a novas posições dentro do bloco receptor, de modo a criar coletânea de amostras teciduais seguindo disposição matricial;
6. Avaliação da qualidade do bloco final para armazenamento.

CONFECÇÃO DO BLOCO DE TMA

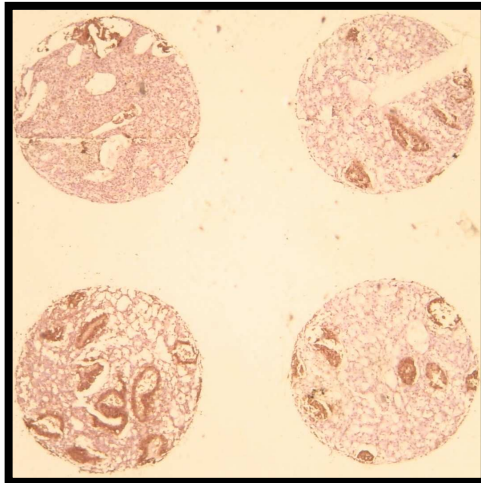


FIGURA 4

TMA – Endometriose Intestinal
Imunomarcada pela Bcl-2
AO 10 x (Figura 4)

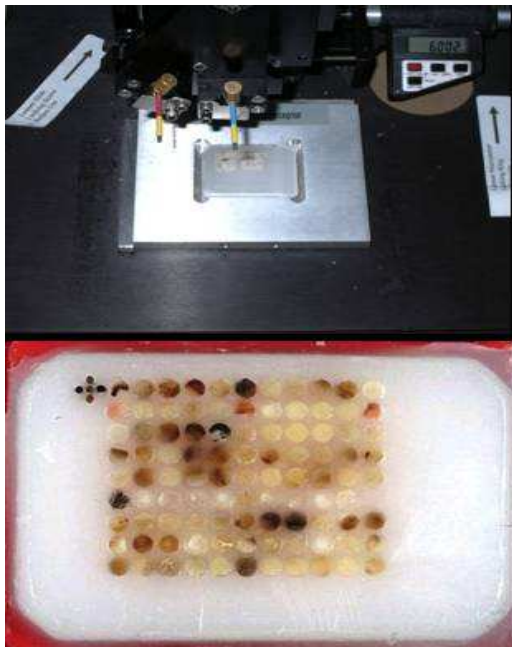


FIGURA 5

Arrayer de tecido (*Beecher Instruments, USA*)
3 amostras teciduais de 0,6 mm cada
4 blocos (total)
Número de casos por bloco: 40
Controles apropriados incluídos

ANEXO 4

REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

1. Cortes histológicos dos tecidos, com 0,6µm de espessura. Montagem dos cortes em lâminas silanizadas, 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 15 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 [Gay-Lussac]), 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 à 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, à temperatura ambiente, durante 20 minutos.

5. Reação de inibição da peroxidase endógena, por meio 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 os anticorpos primários citados anteriormente, nas diluições especificadas pelo fabricante (Bax 1/3.000; Bcl-2 1/200; APAF-1 1/600; Ciclina D1 – 1/650), 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' tetra-hidrocloreto 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. Contracoloração 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 por meio de fixação sobre Entellan Merck, a fim de que a preparação passe a ter conservação permanente.

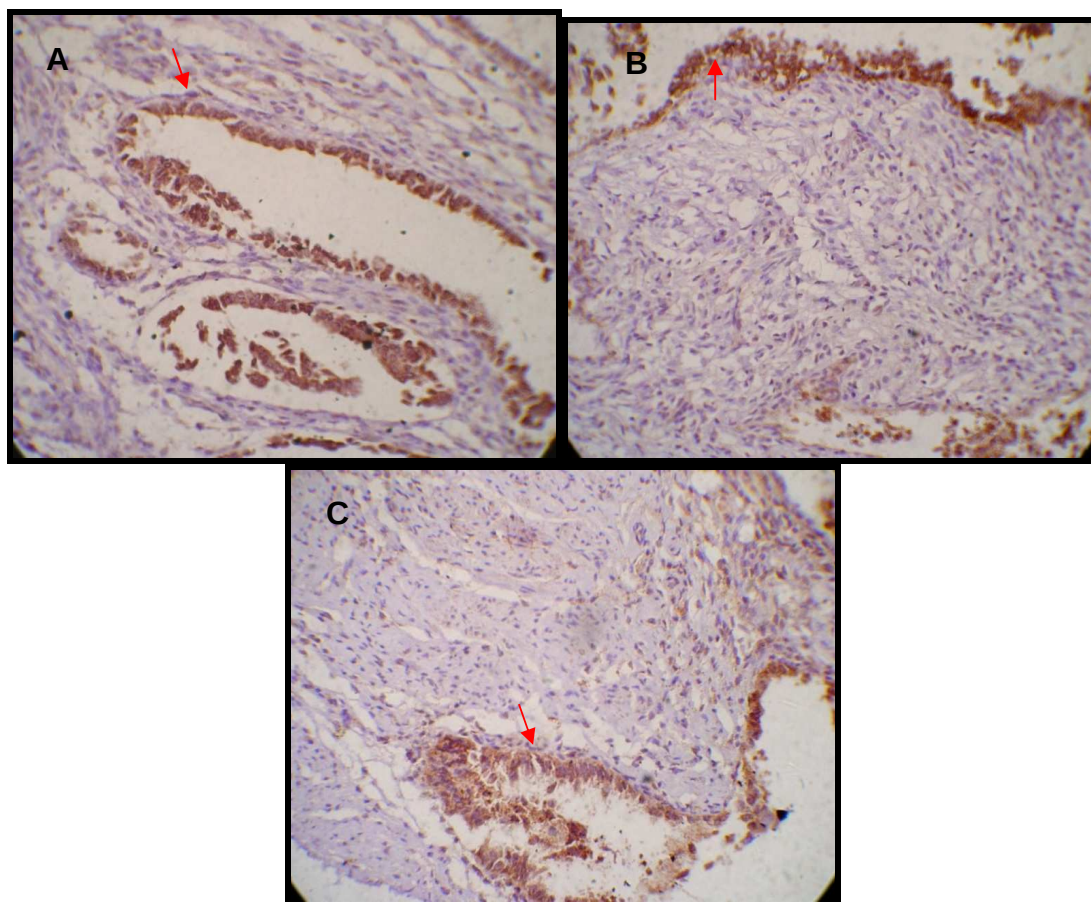
FIGURAS DAS EXPRESSÕES IMUNOISTOQUÍMICAS

FIGURA 6. Imunomarcção pela Apaf-1 AO 400 X - (Escore 2)

A. Intestino **B.** Peritônio **C.** LUS

Seta vermelha: Área de maior significância da imunomarcção.

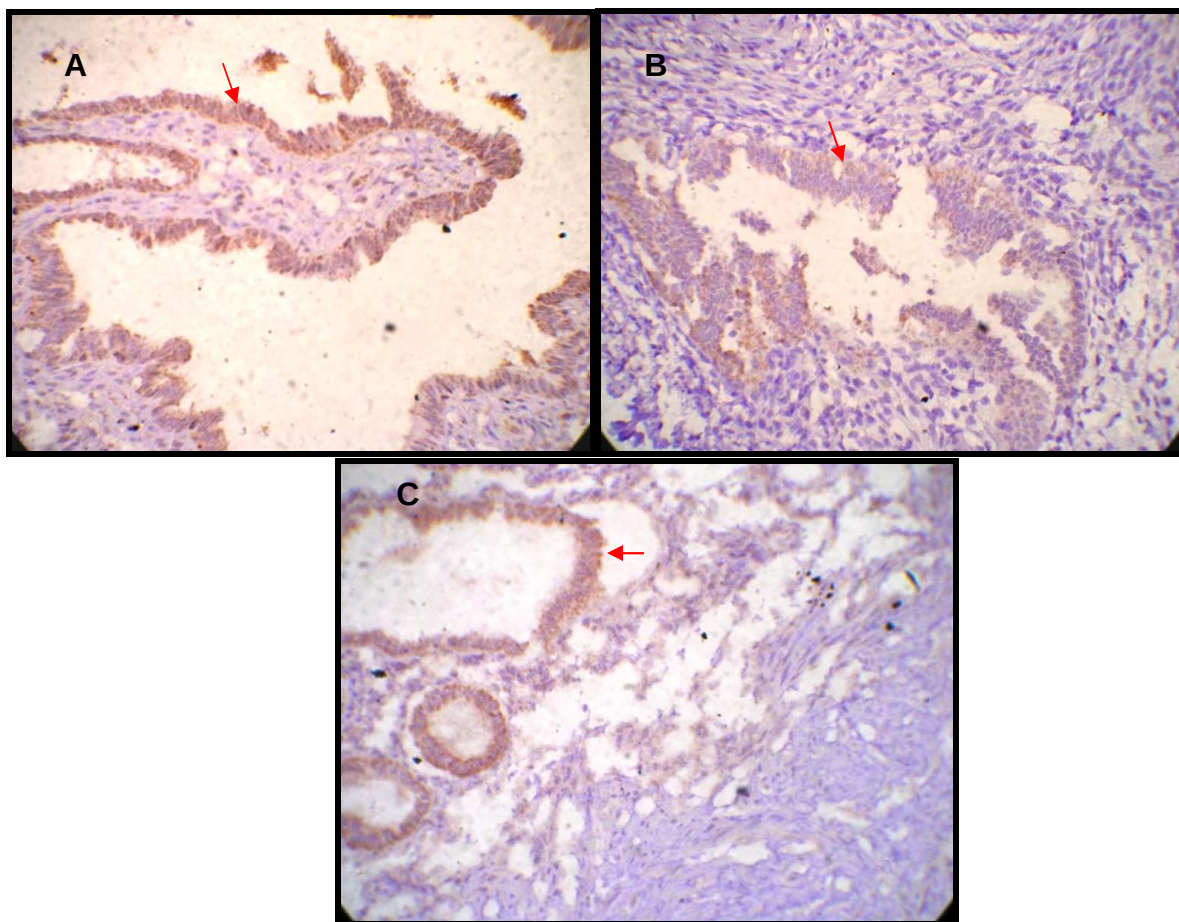


FIGURA 7. Imunomarcação pela BAX AO 400 X - (Escore 1)

A. Intestino **B.** Peritônio **C.** LUS

Seta vermelha: Área de maior significância da imunomarcação.

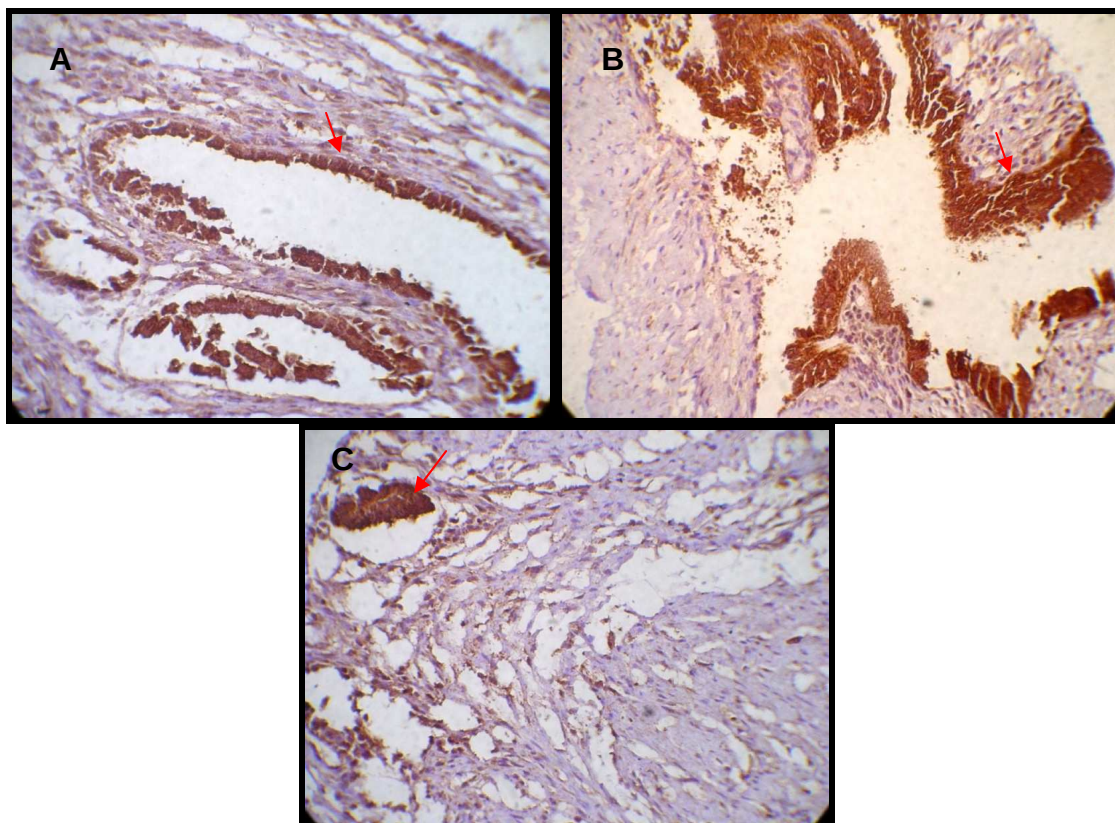


FIGURA 8. Imunomarcção pela BCL-2 AO 400 X - (Escore 3)

A. Intestino **B.** Peritônio **C.** LUS

Seta vermelha: Área de maior significância da imunomarcção.

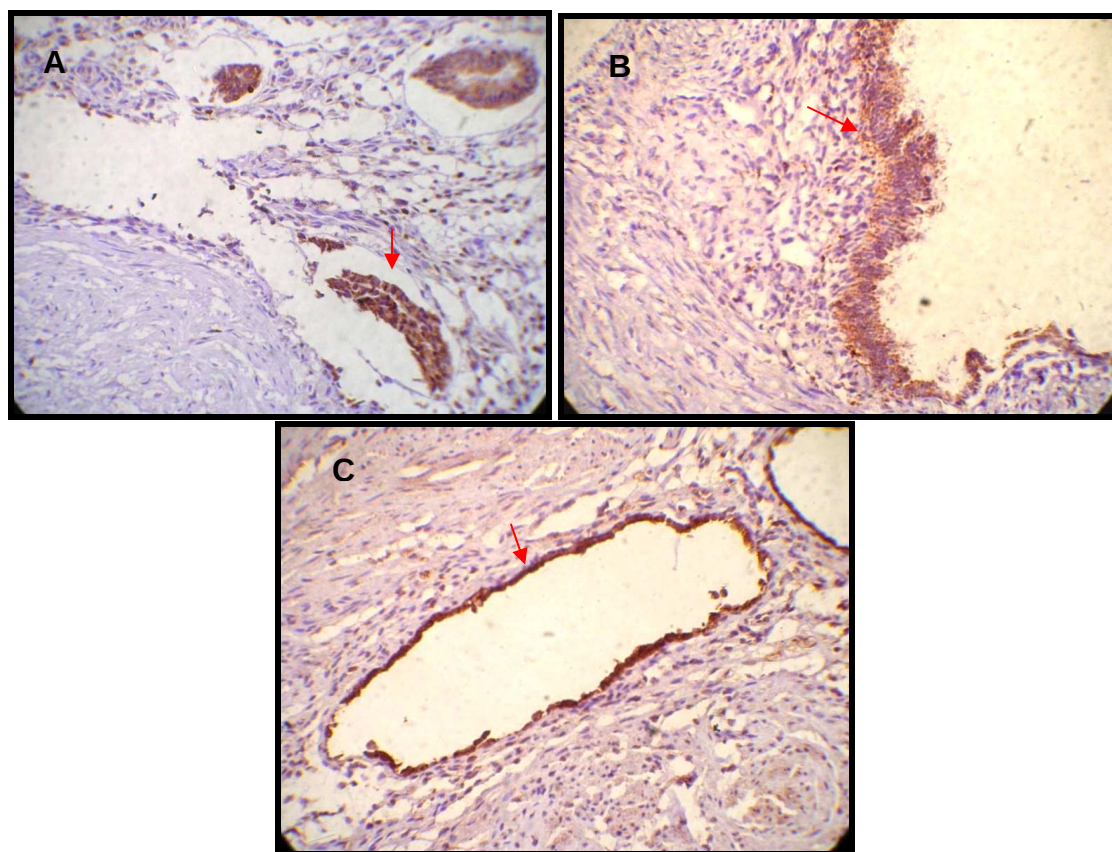


FIGURA 9. Imunomarcação pela Ciclina D1 AO 400 X - (Escore 3)

A. Intestino **B.** Peritônio **C.** LUS

Seta vermelha: Área de maior significância da imunomarcação.

ANEXO 5

FIGURAS DA METODOLOGIA E IMAGENS OBTIDAS PELO (ROD)

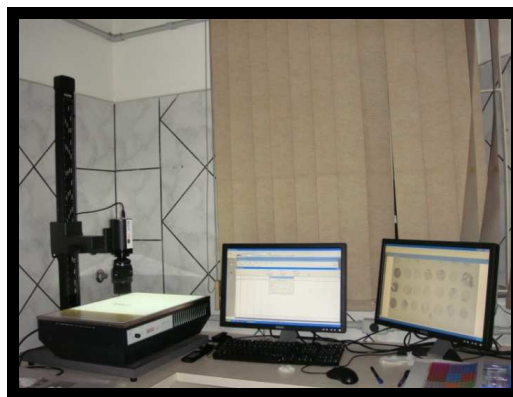


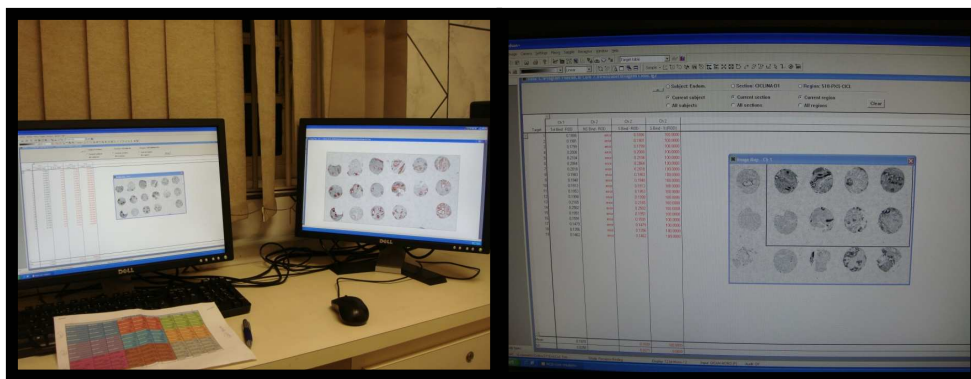
FIGURA 10

(Aparelho *InterFocus Imaging Ltd.*, Linton, England
E sistema de captura e leitura de imagens)

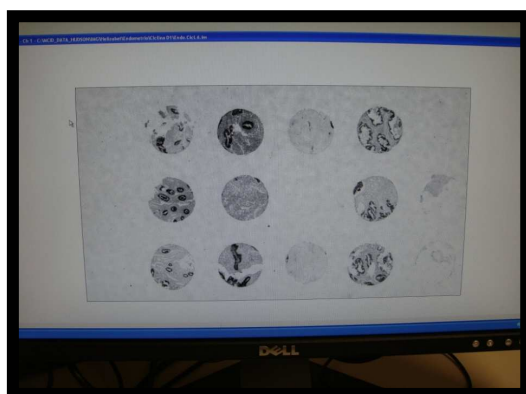


FIGURA 11

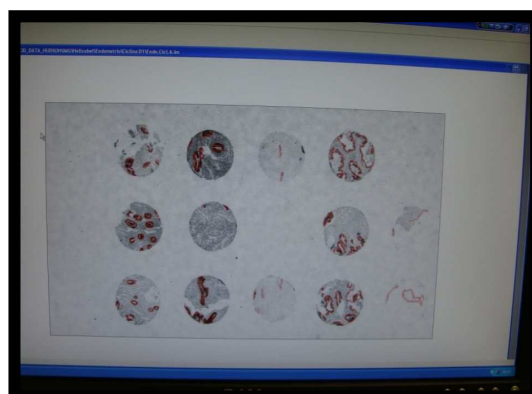
(Aparelho *InterFocus Imaging Ltd.*, Linton, England
E sistema de captura e leitura de imagens)

**FIGURA 12**

Monitores para leitura e captura de imagens

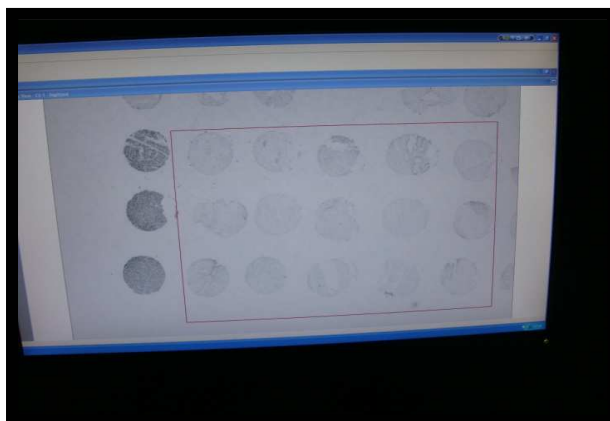
**FIGURA 13**

A – Imagem capturada

**FIGURA 14**

B – Imagem lida (marcação em vermelho)

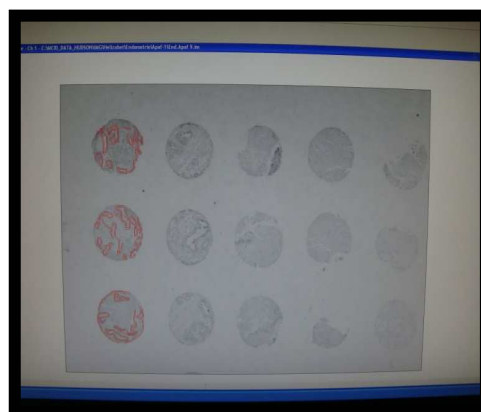
Endométrio – Ciclina D1 (Pacientes: DSS, ERR, APSRD, ELBP, MBA)

**FIGURA 15**

Imagens capturadas - Da esquerda para a direita
(Controle+Pacientes: PXS, KRL,TSS,VMCM,EGS)
(Endométrio- Apaf-1)

**FIGURA 16**

(EGS e VMCM- Marcação em vermelho)
Endométrio Apaf-1

**FIGURA 17**

Endométrio- Apaf-1 (EGS)

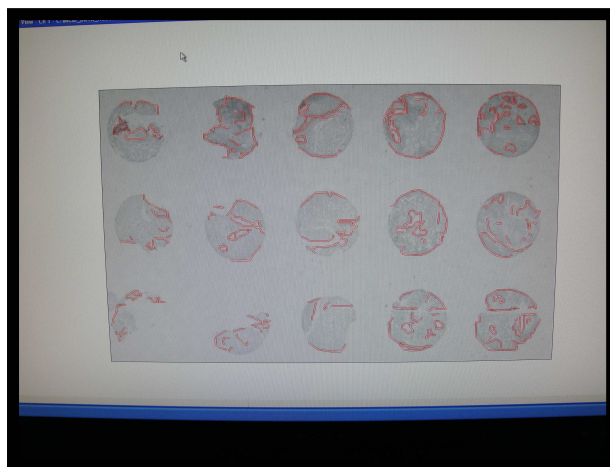


FIGURA 18

Endométrio – Apaf-1
(MBA,ELBP,APSRD,ERR,DSS)

ANEXO 6

Tabela geral das pacientes e dos resultados analisadas pelo método ROD

Paciente	EndoApaf	EndoBax	EndoBcl2	EndoCiclina
522-EGS	0,16094.00000	0,15412.00000	0,12517.00000	0,13419.00000
519-VMCM	0,15245.00000	0,14222.00000	0,12598.00000	0,19586.00000
516- TSS	0,14594.00000	0,14720.00000	0,11924.00000	0,18685.00000
513-KRL	0,13905.00000	0,15030.00000	0,13033.00000	0,16775.00000
510-PXS	0,12588.00000	0,16360.00000	0,11258.00000	0,17873.00000
507-RBO	0,12274.00000	0,19147.00000	0,12069.00000	0,13094.00000
504-EVOF	0,15322.00000	0,14327.00000	0,13497.00000	0,16211.00000
501-JMBB	0,15409.00000	0,14092.00000	0,13516.00000	0,14885.00000
498-PPJ	0,14225.00000	0,15970.00000	0,11731.00000	0,17963.00000
495- VH	0,16326.00000	0,11245.00000	0,10784.00000	0,12914.00000
492- DP	0,15957.00000	0,14956.00000	0,10998.00000	0,13336.00000
489- MS	0,14054.00000	0,17321.00000	0,11117.00000	0,15885.00000
486- MD	0,13079.00000	0,14976.00000	0,15216.00000	0,16034.00000
485-LPK	0,12519.00000	0,13632.00000	0,14048.00000	0,18295.00000
488-RMSM	0,15438.00000	0,15822.00000	0,16856.00000	0,16547.00000
491- NM	0,17787.00000	0,13619.00000	0,11869.00000	0,16043.00000
494- CL	0,16279.00000	0,14519.00000	0,14595.00000	0,12226.00000
497-NLRL	0,13972.00000	0,13160.00000	0,14385.00000	0,23137.00000
500- AEA	0,14809.00000	0,14988.00000	0,15497.00000	0,13686.00000
503-JFR	0,13125.00000	0,12812.00000	0,11958.00000	0,19161.00000
506- FB	0,17930.00000	0,15054.00000	0,15625.00000	0,15858.00000
509-DSS	0,14885.00000	0,12038.00000	0,12177.00000	0,11370.00000
512-ERR	0,15116.00000	0,16879.00000	0,11969.00000	0,18832.00000
515- AP	0,11742.00000	0,13785.00000	0,11626.00000	0,13234.00000
518- EL	0,14630.00000	0,17836.00000	0,13295.00000	0,22955.00000
521- MB	0,12115.00000	0,16996.00000	0,12795.00000	0,20994.00000
523-RMSP	0,15488.00000	0,17122.00000	0,13154.00000	0,21998.00000
520- RE	0,14537.00000	0,13690.00000	0,12549.00000	0,16365.00000
517- AC	0,15231.00000	0,14877.00000	0,14382.00000	0,19089.00000
514- EN	0,15701.00000	0,13703.00000	0,12392.00000	0,17639.00000
511-MPF	0,13215.00000	0,15361.00000	0,11490.00000	0,14090.00000
508-TMRM	0,17015.00000	0,14329.00000	0,12250.00000	0,15330.00000
505- PM	0,12108.00000	0,12572.00000	0,12328.00000	0,14342.00000
502- SP	0,12199.00000	0,12592.00000	0,12069.00000	0,21406.00000
499- IG	0,16005.00000	0,14381.00000	0,12000.00000	0,19580.00000
496- SCA	0,14532.00000	0,14085.00000	0,12132.00000	0,14674.00000
493-MEDX	0,10940.00000	0,14841.00000	0,12855.00000	0,13916.00000
490 AVEN	0,12391.00000	0,13522.00000	0,13081.00000	0,17611.00000
487-MLY	0,17360.00000	0,15796.00000	0,11882.00000	0,24521.00000
484-APTD	0,14180.00000	0,13593.00000	0,11800.00000	0,15156.00000

Cont.

Tabela geral das pacientes e dos resultados analisadas pelo método ROD

Continuação

Paciente	IntestinoApaf	IntestinoBax	IntestinoBcl2	IntestinoCiclina
522-EGS	0,15092.00000	0,18260.00000	0,14368.00000	0,16266.00000
519-VMCM	0,15450.00000	0,16433.00000	0,14180.00000	0,15850.00000
516- TSS	0,14530.00000	0,34693.00000	0,16183.00000	0,13366.00000
513-KRL	0,14122.00000	0,20968.00000	0,17223.00000	0,15395.00000
510-PXS	0,16565.00000	0,20042.00000	0,13984.00000	0,12757.00000
507-RBO	0,16700.00000	0,22685.00000	0,13833.00000	0,13378.00000
504-EVOF	0,17845.00000	0,24930.00000	0,15633.00000	0,14015.00000
501-JMBB	0,11855.00000	0,12673.00000	0,18070.00000	0,11414.00000
498 -PPJ	0,13890.00000	0,15810.00000	0,13177.00000	0,12042.00000
495 - VH	0,15070.00000	0,14890.00000	0,13280.00000	0,11853.00000
492 - DP	0,12560.00000	0,14120.00000	0,13727.00000	0,11476.00000
489 - MS	0,16925.00000	0,14710.00000	0,12630.00000	0,11642.00000
486 - MD	0,13490.00000	0,13844.00000	0,13667.00000	0,13294.00000
485-LPK	0,13865.00000	0,14516.00000	0,15320.00000	0,14726.00000
488-RMSM	0,13977.00000	0,16077.00000	0,12470.00000	0,13827.00000
491 - NM	0,14405.00000	0,13130.00000	0,13450.00000	0,11395.00000
494- CL	0,13047.00000	0,14990.00000	0,12030.00000	0,11489.00000
497-NLRL	0,16205.00000	0,17250.00000	0,14685.00000	0,14813.00000
500- AEA	0,12425.00000	0,12726.00000	0,13897.00000	0,11830.00000
503-JFR	0,12327.00000	0,15550.00000	0,14343.00000	0,11897.00000
506 - FB	0,14305.00000	0,16716.00000	0,14180.00000	0,12599.00000
509-DSS	0,12880.00000	0,15850.00000	0,12230.00000	0,11457.00000
512 -ERR	0,16830.00000	0,18560.00000	0,13953.00000	0,12967.00000
515 - AP	0,17510.00000	0,17271.00000	0,11985.00000	0,12475.00000
518 - EL	0,15813.00000	0,13585.00000	0,12530.00000	0,12305.00000
521 - MB	0,15565.00000	0,16117.00000	0,16900.00000	0,12501.00000
523-RMSP	0,13705.00000	0,17133.00000	0,15277.00000	0,12837.00000
520 - RE	0,14050.00000	0,14490.00000	0,13690.00000	0,11785.00000
517 - AC	0,14283.00000	0,17247.00000	0,13693.00000	0,13338.00000
514 - EN	0,16180.00000	0,17550.00000	0,17060.00000	0,17638.00000
511-MPF	0,11388.00000	0,13484.00000	0,12640.00000	0,11094.00000
508-TMRM	0,14055.00000	0,15660.00000	0,14250.00000	0,12073.00000
505 - PM	0,13700.00000	0,15737.00000	0,14830.00000	0,12013.00000
502 - SP	0,16010.00000	0,16960.00000	0,13455.00000	0,12306.00000
499 - IG	0,14370.00000	0,15595.00000	0,16715.00000	0,12175.00000
496- SCA	0,12390.00000	0,13645.00000	0,12707.00000	0,11325.00000
493-MEDX	0,17000.00000	0,15463.00000	0,14698.00000	0,13092.00000
490 AVEN	0,15560.00000	0,14017.00000	0,13240.00000	0,11539.00000
487-MLY	0,12875.00000	0,16215.00000	0,14839.00000	0,13415.00000
484-APTĐ	0,13330.00000	0,12895.00000	0,13764.00000	0,11189.00000

Cont.

Tabela geral das pacientes e dos resultados analisadas pelo método ROD

Continuação

Paciente	LUSApaf	LUSBax	LUSBcl2	LUSCiclina
522-EGS	0,12717.00000	0,12770.00000	0,12150.00000	0,16280.00000
519-VMCM	0,11721.00000	0,12630.00000	0,11392.00000	0,12680.00000
516- TSS	0,11575.00000	0,14090.00000	0,11870.00000	0,13210.00000
513-KRL	0,11180.00000	0,13380.00000	0,11526.00000	0,14015.00000
510-PXS	0,10900.00000	0,13490.00000	0,11477.00000	0,16030.00000
507-RBO	0,12011.00000	0,13970.00000	0,11995.00000	0,14048.00000
504-EVOF	0,10945.00000	0,12730.00000	0,11766.00000	0,11702.00000
501-JMBB	0,11288.00000	0,12910.00000	0,11676.00000	0,11957.00000
498 -PPJ	0,10561.00000	0,12910.00000	0,12462.00000	0,12707.00000
495 - VH	0,11656.00000	0,12600.00000	0,12366.00000	0,12997.00000
492 - DP	0,11194.00000	0,11940.00000	0,12568.00000	0,11867.00000
489 - MS	0,12247.00000	0,13500.00000	0,12446.00000	0,12637.00000
486 - MD	0,10583.00000	0,11220.00000	0,11914.00000	0,11207.00000
485-LPK	0,11735.00000	0,11730.00000	0,12108.00000	0,11321.00000
488-RMSM	0,10665.00000	0,11730.00000	0,11213.00000	0,12353.00000
491 - NM	0,11537.00000	0,12400.00000	0,11290.00000	0,11764.00000
494- CL	0,10829.00000	0,12710.00000	0,11604.00000	0,12305.00000
497-NLRL	0,10610.00000	0,12480.00000	0,11335.00000	0,12208.00000
500- AEA	0,11310.00000	0,12600.00000	0,11328.00000	0,12322.00000
503-JFR	0,10767.00000	0,12430.00000	0,10783.00000	0,12006.00000
506 - FB	0,10853.00000	0,12470.00000	0,11283.00000	0,11865.00000
509-DSS	0,11505.00000	0,13000.00000	0,11650.00000	0,11785.00000
512 -ERR	0,11157.00000	0,12280.00000	0,11800.00000	0,12016.00000
515 - AP	0,11498.00000	0,13220.00000	0,12059.00000	0,12624.00000
518 - EL	0,11970.00000	0,12780.00000	0,11607.00000	0,12230.00000
521 - MB	0,12112.00000	0,12250.00000	0,12152.00000	0,12102.00000
523-RMSP	0,11402.00000	0,12960.00000	0,12172.00000	0,13206.00000
520 - RE	0,12065.00000	0,13460.00000	0,11860.00000	0,12846.00000
517 - AC	0,10533.00000	0,11430.00000	0,10944.00000	0,10846.00000
514 - EN	0,12550.00000	0,12750.00000	0,10988.00000	0,10696.00000
511-MPF	0,12241.00000	0,13780.00000	0,11534.00000	0,11154.00000
508-TMRM	0,11049.00000	0,12740.00000	0,11132.00000	0,11300.00000
505 - PM	0,12276.00000	0,15190.00000	0,11388.00000	0,11251.00000
502 - SP	0,11319.00000	0,14150.00000	0,11983.00000	0,11367.00000
499 - IG	0,11291.00000	0,14110.00000	0,10933.00000	0,12007.00000
496- SCA	0,11660.00000	0,11960.00000	0,11100.00000	0,11380.00000
493-MEDX	0,11659.00000	0,13720.00000	0,11901.00000	0,13309.00000
490 AVEN	0,10676.00000	0,12440.00000	0,12353.00000	0,11969.00000
487-MLY	0,11611.00000	0,12980.00000	0,11436.00000	0,11577.00000
484-APTD	0,10915.00000	0,12320.00000	0,12099.00000	0,11887.00000

Cont.

Tabela geral das pacientes e dos resultados analisadas pelo método ROD

Continuação

Paciente	PeriApaf	PeriBax	PeriBcl2	PeriCiclina
522-EGS	0,13050.00000	0,12835.00000	0,11448.00000	0,12300.00000
519-VMCM	0,15012.00000	0,15106.00000	0,11961.00000	0,13963.00000
516- TSS	0,18272.00000	0,14255.00000	0,11693.00000	0,13390.00000
513-KRL	0,17060.00000	0,15310.00000	0,11585.00000	0,14193.00000
510-PXS	0,18322.00000	0,13390.00000	0,11663.00000	0,13225.00000
507-RBO	0,15200.00000	0,13125.00000	0,12045.00000	0,11000.00000
504-EVOF	0,18072.00000	0,13125.00000	0,12099.00000	0,10717.00000
501-JMBB	0,14667.00000	0,12225.00000	0,12895.00000	0,10770.00000
498 -PPJ	0,16690.00000	0,12710.00000	0,11560.00000	0,11213.00000
495 - VH	0,17656.00000	0,12850.00000	0,11925.00000	0,12940.00000
492 - DP	0,12193.00000	0,13260.00000	0,11060.00000	0,11427.00000
489 - MS	0,16003.00000	0,14430.00000	0,12495.00000	0,12130.00000
486 - MD	0,11317.00000	0,14430.00000	0,10315.00000	0,10795.00000
485-LPK	0,17357.00000	0,15157.00000	0,11365.00000	0,12163.00000
488-RMSM	0,16564.00000	0,13123.00000	0,11538.00000	0,15630.00000
491 - NM	0,14886.00000	0,14615.00000	0,10990.00000	0,12630.00000
494- CL	0,17126.00000	0,14830.00000	0,11005.00000	0,16483.00000
497-NLRL	0,14300.00000	0,18147.00000	0,11921.00000	0,13023.00000
500- AEA	0,13310.00000	0,12450.00000	0,10748.00000	0,12775.00000
503-JFR	0,11920.00000	0,13316.00000	0,11407.00000	0,12367.00000
506 - FB	0,16020.00000	0,14043.00000	0,11610.00000	0,13240.00000
509-DSS	0,18453.00000	0,12897.00000	0,11250.00000	0,12180.00000
512 -ERR	0,16118.00000	0,12891.00000	0,11670.00000	0,15707.00000
515 - AP	0,17870.00000	0,13370.00000	0,11830.00000	0,11393.00000
518 - EL	0,12985.00000	0,15690.00000	0,12470.00000	0,13243.00000
521 - MB	0,12330.00000	0,11820.00000	0,11083.00000	0,12365.00000
523-RMSP	0,12167.00000	0,13525.00000	0,11285.00000	0,10663.00000
520 - RE	0,15107.00000	0,12743.00000	0,11653.00000	0,12705.00000
517 - AC	0,14166.00000	0,11850.00000	0,11000.00000	0,14427.00000
514 - EN	0,15755.00000	0,12675.00000	0,10935.00000	0,11845.00000
511-MPF	0,13690.00000	0,13048.00000	0,11522.00000	0,13240.00000
508-TMRM	0,15607.00000	0,13370.00000	0,11718.00000	0,11663.00000
505 - PM	0,14488.00000	0,16566.00000	0,12078.00000	0,13453.00000
502 - SP	0,15432.00000	0,16050.00000	0,12060.00000	0,15323.00000
499 - IG	0,17120.00000	0,11700.00000	0,10985.00000	0,11780.00000
496- SCA	0,12160.00000	0,13525.00000	0,11080.00000	0,10905.00000
493-MEDX	0,12848.00000	0,12413.00000	0,11690.00000	0,11420.00000
490 AVEN	0,13352.00000	0,13073.00000	0,11485.00000	0,11480.00000
487-MLY	0,14160.00000	0,11850.00000	0,11445.00000	0,12350.00000
484-APTD	0,14195.00000	0,13340.00000	0,11508.00000	0,12066.00000

Tabela geral das pacientes e dos resultados analisadas pelo Escore

NOME	REGISTRO	IDADE	IMC	Endométrio BCL2	Endométrio CiclinaD1	Endométrio BAX	Endométrio APAF
APTD	728120	31	22,1.0	2	2	0	1
LPK	728128	34	23,3.0	2	3	0	0
MDA	992804	40	24,0.0	2	3	0	0
LMY	731574	41	25,0.0	2	2	0	1
RMSM	731619	39	20,7.0	1	2	0	1
MSPC	731753	43	28,2.0	1	2	1	1
AVFN	29712	43	23,3.0	2	2	0	1
NMS	734521	41	25,0.0	3	3	0	0
DPDCR	734574	39	20,2.0	2	2	0	1
MEDXM	739844	41	19,8.0	2	1	1	1
CL	739859	34	22,8.0	1	1	0	0
VHLD	743419	38	21,0.0	2	1	0	1
SCA	743629	43	23,9.0	1	1	0	0
NLRLO	746994	35	23,3.0	3	2	0	1
PPJU	760911	36	20,7.0	3	2	0	0
IGF	760954	27	26,9.0	3	1	0	0
AEACV	526043	37	21,7.0	2	3	0	0
JMBBL	776023	40	21,2.0	2	2	0	0
SP	776063	41	22,2.0	3	2	0	1
JFR	530092	34	21,2.0	3	2	1	1
EVOF	783124	39	23,3.0	3	2	0	1
PMSS	796790	32	20,1.0	3	2	0	0
FBP	796870	30	20,9.0	1	1	0	0
RBO	1460539	35	23,3.0	2	1	0	1
TMRM	814439	34	25,0.0	2	2	1	0
DSS	817049	39	25,6.0	2	1	0	0
PXS	817115	30	25,6.0	3	2	0	0
MPF	830427	27	26,6.0	3	2	0	0
ERR	833870	46	31,2.0	2	1	0	0
KRL	840705	33	20,2.0	3	2	0	1
ENI	840767	39	22,5.0	3	2	1	0
APSRD	843890	35	21,2.0	3	2	1	0
TSS	139823	31	20,7.0	3	1	0	1
ACAS	139847	33	20,1.0	3	2	0	0
ELBP	880518	35	22,4.0	3	3	1	0
VMCM	883755	44	25,6.0	2	3	1	1
REIM	886502	35	22,2.0	2	3	0	1
MBA	887042	26	26,2.0	3	2	1	0
EGS	887119	35	22,5.0	3	2	0	1
RMSP	893626	40	23,3.0	2	3	1	0

Cont.

Tabela geral das pacientes e dos resultados analisadas pelo Escore

Continuação

NOME	REGISTRO	IDADE	IMC	Peritônio APAF	Peritônio BCL2	Peritônio CiclinaD1	Peritônio BAX
APTD	728120	31	22,1.0	0	2	1	0
LPK	728128	34	23,3.0	2	3	0	0
MDA	992804	40	24,0.0	1	2	1	0
LMY	731574	41	25,0.0	2	2	0	0
RMSM	731619	39	20,7.0	2	3	0	0
MSPC	731753	43	28,2.0	1	2	0	0
AVFN	29712	43	23,3.0	1	3	1	0
NMS	734521	41	25,0.0	1	2	0	0
DPDCR	734574	39	20,2.0	0	2	1	0
MEDXM	739844	41	19,8.0	0	3	0	0
CL	739859	34	22,8.0	1	2	0	0
VHLD	743419	38	21,0.0	2	3	0	0
SCA	743629	43	23,9.0	0	2	0	0
NLRLO	746994	35	23,3.0	1	2	0	0
PPJU	760911	36	20,7.0	2	2	1	0
IGF	760954	27	26,9.0	2	2	2	0
AEACV	526043	37	21,7.0	2	2	1	0
JMBBL	776023	40	21,2.0	0	2	2	0
SP	776063	41	22,2.0	1	2	1	0
JFR	530092	34	21,2.0	0	2	2	0
EVOF	783124	39	23,3.0	1	2	2	0
PMSS	796790	32	20,1.0	0	3	2	0
FBP	796870	30	20,9.0	1	3	2	0
RBO	1460539	35	23,3.0	1	2	2	0
TMRM	814439	34	25,0.0	2	2	1	0
DSS	817049	39	25,6.0	2	2	2	0
PXS	817115	30	25,6.0	2	2	1	0
MPF	830427	27	26,6.0	0	2	1	0
ERR	833870	46	31,2.0	1	3	1	0
KRL	840705	33	20,2.0	2	3	1	0
ENI	840767	39	22,5.0	1	3	1	0
APSRD	843890	35	21,2.0	1	2	2	0
TSS	139823	31	20,7.0	2	3	1	0
ACAS	139847	33	20,1.0	1	3	0	0
ELBP	880518	35	22,4.0	1	2	1	0
VMCM	883755	44	25,6.0	2	2	2	0
REIM	886502	35	22,2.0	1	2	0	0
MBA	887042	26	26,2.0	1	2	1	0
EGS	887119	35	22,5.0	1	2	2	0
RMSP	893626	40	23,3.0	0	2	1	0

Cont.

Tabela geral das pacientes e dos resultados analisadas pelo Escore

Continuação

NOME	REGISTRO	IDADE	IMC	LUS BCL2	LUS CiclinaD1	LUS BAX	LUS APAF
APTD	728120	31	22,1.0	3	1	2	2
LPK	728128	34	23,3.0	3	1	0	2
MDA	992804	40	24,0.0	2	1	0	1
LMY	731574	41	25,0.0	2	1	0	1
RMSM	731619	39	20,7.0	1	1	0	0
MSPC	731753	43	28,2.0	2	1	0	0
AVFN	29712	43	23,3.0	2	1	0	0
NMS	734521	41	25,0.0	3	2	1	1
DPDCR	734574	39	20,2.0	2	1	0	0
MEDXM	739844	41	19,8.0	3	1	0	0
CL	739859	34	22,8.0	2	1	0	0
VHLD	743419	38	21,0.0	2	1	0	0
SCA	743629	43	23,9.0	3	1	0	1
NLRLO	746994	35	23,3.0	2	1	0	1
PPJU	760911	36	20,7.0	2	1	0	0
IGF	760954	27	26,9.0	2	2	1	3
AEACV	526043	37	21,7.0	2	1	0	1
JMBBL	776023	40	21,2.0	2	1	0	0
SP	776063	41	22,2.0	2	2	1	2
JFR	530092	34	21,2.0	2	1	1	2
EVOF	783124	39	23,3.0	2	1	0	2
PMSS	796790	32	20,1.0	2	2	1	2
FBP	796870	30	20,9.0	2	1	0	0
RBO	1460539	35	23,3.0	2	1	0	0
TMRM	814439	34	25,0.0	2	1	1	1
DSS	817049	39	25,6.0	2	1	0	1
PXS	817115	30	25,6.0	2	1	0	0
MPF	830427	27	26,6.0	2	1	0	0
ERR	833870	46	31,2.0	2	1	0	1
KRL	840705	33	20,2.0	2	1	0	0
ENI	840767	39	22,5.0	3	1	0	0
APSRD	843890	35	21,2.0	2	1	1	1
TSS	139823	31	20,7.0	2	1	0	1
ACAS	139847	33	20,1.0	2	1	0	1
ELBP	880518	35	22,4.0	2	1	0	1
VMCM	883755	44	25,6.0	2	1	0	0
REIM	886502	35	22,2.0	2	2	1	0
MBA	887042	26	26,2.0	2	1	0	1
EGS	887119	35	22,5.0	2	1	1	1
RMSP	893626	40	23,3.0	3	1	1	2

Cont.

Tabela geral das pacientes e dos resultados analisadas pelo Escore

Continuação

NOME	REGISTRO	IDADE	IMC	Intestino BCL2	Intestino CiclinaD1	Intestino BAX	Intestino APAF
APTD	728120	31	22,1.0	2	1	0	2
LPK	728128	34	23,3.0	2	3	0	2
MDA	992804	40	24,0.0	3	2	0	2
LMY	731574	41	25,0.0	2	3	0	2
RMSM	731619	39	20,7.0	2	1	0	2
MSPC	731753	43	28,2.0	2	2	0	2
AVFN	29712	43	23,3.0	3	1	0	1
NMS	734521	41	25,0.0	2	2	0	1
DPDCR	734574	39	20,2.0	2	1	0	2
MEDXM	739844	41	19,8.0	2	1	0	2
CL	739859	34	22,8.0	2	2	0	2
VHLD	743419	38	21,0.0	3	1	0	1
SCA	743629	43	23,9.0	2	2	0	1
NLRLO	746994	35	23,3.0	3	2	1	1
PPJU	760911	36	20,7.0	2	1	0	1
IGF	760954	27	26,9.0	3	3	0	2
AEACV	526043	37	21,7.0	2	1	0	1
JMBBL	776023	40	21,2.0	2	2	0	1
SP	776063	41	22,2.0	3	3	0	2
JFR	530092	34	21,2.0	2	1	1	2
EVOF	783124	39	23,3.0	2	3	0	2
PMSS	796790	32	20,1.0	2	2	0	1
FBP	796870	30	20,9.0	3	2	0	1
RBO	1460539	35	23,3.0	2	2	0	2
TMRM	814439	34	25,0.0	3	2	0	0
DSS	817049	39	25,6.0	2	1	0	1
PXS	817115	30	25,6.0	2	2	0	0
MPF	830427	27	26,6.0	2	3	1	1
ERR	833870	46	31,2.0	3	2	0	2
KRL	840705	33	20,2.0	3	2	1	0
ENI	840767	39	22,5.0	3	3	0	2
APSRD	843890	35	21,2.0	2	2	0	0
TSS	139823	31	20,7.0	2	2	0	0
ACAS	139847	33	20,1.0	2	2	0	0
ELBP	880518	35	22,4.0	2	2	0	0
VMCM	883755	44	25,6.0	2	2	0	0
REIM	886502	35	22,2.0	2	1	0	0
MBA	887042	26	26,2.0	2	2	1	1
EGS	887119	35	22,5.0	2	2	0	0
RMSP	893626	40	23,3.0	2	2	0	1

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrão MS, Podgaec S, Izzo CR, Melo PV, Porto RC, Ramos LO, et al. Perfil epidemiológico e clínico da endometriose: estudo de 180 casos. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 1995; 17:779-84.

Abrão MS, Nogueira AP, Petta CA, Ferriani RA. Novas teorias sobre a etiopatogênia da endometriose. *Femina.* 2000; 28:429-34.

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.

ACOG. Endometriosis. ACOG technical bulletin number 184--September 1993. *Int J Gynaecol Obstet.* 1993; 43:221-7.

Amin Z, Kanarek K, Krupitsky E, Walderhaug E, Ilomäki R, Blumberg H, et al. A sequencing-based survey of functional APAF1 alleles in a large sample of individuals with affective illness and population controls. *Am J Med Genet B* [on line] 2010;153B:332-5. [cited 2010 Jan 23] Available from: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/123221233/issue>

Anaf V, Simon P, El Nakadi I, Fayt I, Buxant F, Simonart T, et al. Relationship between endometriotic foci and nerves in rectovaginal endometriotic nodules. *Hum Reprod.* 2000;15:1744-50

Badawy SZ, Freedman L, Numann P, Bonaventura M, Kim S. Diagnosis and management of intestinal endometriosis. A report of five cases. *J Reprod Med.* 1988;33:851-5.

Ballweg ML. Selected food intake and risk of endometriosis. *Hum Reprod.* 2005; 20:312-3; author reply 313.

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 - Escola Paulista de Medicina; 1999.

Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest.* 1986; 55:244-8.

Bedone AJ, Monteiro IMU, Canfour CC, Ribeiro Filho AD. Correlação entre manifestações clínicas e achados laparoscópicos em pacientes com endometriose pélvica. *Reprodução.* 1994; 9:19-21.

Béliard A, Noël A, Foldart JM. Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertil Steril.* 2004; 82:80-5.

Béltran MA, Tapia QTF, Araos HF, Martinez GH, Cruces KS. Endometriosis del íleon como causa de obstrucción intestinal. *Rev Med Chil.* 2006;134: 485-90.

Bilotas M, Baraňao RI, Buquet R, Sueldo C, Tesone M, Meresman G. Effect of GnRH analogues on apoptosis and expression of Bcl-2, Bax, Fas and FasL proteins in endometrial epithelial cell cultures from patients with endometriosis and controls. *Hum Reprod.* 2007; 22:644-53.

Boling RO, Abbasi R, Ackerman G, Shipul AH Jr, Chaney SA. Disability from endometriosis in United States Army. *J Reprod Med.* 1988; 33:49-52.

Borroni R, Di Blasio AM, Gaffuri B, Santorsola R, Busacca M, Viganò P, et al. Expression of GnRH receptor gene in human ectopic endometrial cells and inhibition of their proliferation by leuprolide acetate. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 159:37-43.

Braun DP, Gebel H, Rotman C, Rana N, Dmowski WP. The development of cytotoxicity in peritoneal macrophages from women with endometriosis. *Fertil Steril.* 1992; 57:1203-10.

Braun DP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Dmowski WP. Relationship between apoptosis and the number of macrophages in eutopic endometrium from women with and without endometriosis. *Fertil Steril.* 2002; 78:830-5.

Braun DP, Ding J, Shaheen F, Willey JC, Rana N, Dmowski P. Quantitative expression of apoptosis-regulating genes in endometrium from women with and without endometriosis. *Fertil Steril.* 2007; 87:263-8.

Brosens IA, Brosens JJ. Redefining endometriosis: is deep endometriosis a progressive disease? *Hum Reprod.* 2000; 15:1-3.

Brouwer R, Woods RJ. Rectal endometriosis: results of radical excision and review of published work. *ANZ J Surg.* 2007;77:562-71.

Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999; 15:269-90.

Canis M, Botchofishvili R, Slim K, Pezet D, Pouly JL, Wattiez A, et al Endometriose digestive: a propôs de huit cas de reséction colorectale. *J Gynecol Obstet Biol Reprod. (Paris)* 1996; 25:699-709.

Cerami A. Inflammatory cytokines. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 62:S3-S10.

Chao JR, Wang JM, Lee SF, Peng HW, Lin YH, Chou CH, et al. mcl-1 is an immediate-early gene activated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) signaling pathway and is one component of the GM-CSF viability response. *Mol Cell Biol.* 1998; 18:4883-98.

Chapron C, Dubuisson JB. Management of deep endometriosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 943:276-80.

Chapron C. D`après la communication de chronic pelvic pain and endometriosis. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2003; 32(8 pt 2):S32-S36.

Chapron C, Chopin N, Borghese B, Foulot H. Deeply infiltrating endometriosis originates from the retrocervical area. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*. 2004;11:440; author reply 440-1.

Chapron C, Chopin N, Borghese B, Foulot H, Dousset B, Vacher-Lavenu MC, et al. Deeply infiltrating endometriosis: pathogenetic implications of the anatomical distribution. *Hum Reprod*. 2006; 21:1839-45.

Chen W, Foran DJ. Advances in cancer tissue microarray technology: Towards improved understanding and diagnostics. *Anal Chim Acta*. 2006; 564:74-81.

Cornillie FJ, Oosterlinck D, Lauwereyns JM, Koninkx PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histological and clinical significance. *Fertil Steril*. 1990; 53:978-83.

Craninx M, D'Haens G, Cokelaere K, Baert F, Peninckx F, D'Hoore A, et al. Crohn's disease and intestinal endometriosis: an intriguing co-existence. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2000; 12:217-21.

Critchley HO, Jones RL, Lea RG, Drudy TA, Kelly RW, Williams AR, et al. Role of inflammatory mediators in human endometrium during progesterone withdrawal and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84:240-8.

Cullen TS. The distribution of adenomyomas containing uterine mucosa. *Arch Surg*. 1920;12:15-83.

Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*. 2000; 10:369-77.

Dmowski WP, Gebel H, Braun DP. Decreased apoptosis and sensitivity to macrophage mediated cytolysis of endometrial cells in endometriosis. *Hum Reprod Update*. 1998; 4:696-701.

Dmowski WP, Ding J, Shen J, Rana N, Fernandez BB, Braun DP. Apoptosis in endometrial glandular and stromal cells in women with and without endometriosis. *Hum Reprod*. 2001; 16:1802-8.

Donnez J, Nisolle M, Smoes P, Gillet N, Beguin S, Casana-Roux F. Peritoneal endometriosis and endometriotic nodules of the rectovaginal septum are two different entities. *Fertil Steril*. 1996; 66:362-8.

Dufournet C, Uzan C, Fauvet R, Cortez A, Siffroi JP, Darai E. Expression of apoptosis-related proteins in peritoneal, ovarian and colorectal endometriosis. *J Reprod Immunol*. 2006; 70:151-62.

Ellis MJ, Tao Y, Young O, White S, Proia AD, Murray J, et al. Estrogen-independent proliferation is present in estrogen-receptor HER2- positive primary breast cancer after neoadjuvant letrozole. *J Clin Oncol*. 2006; 24:3019-25.

Eskenazi B, Warner ML. Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1997; 24:235-58.

Farias R E, Souza A R, Aarestrup FM. Avaliação da apoptose no carcinoma ductal infiltrante da mama: associação com graus histológicos e fatores prognósticos. *Rev Bras Cancerol.* 2005; 51:209-18.

Fauvet R, Poncelet C, Hugol D, Lavaur A, Feldman G, Daraï E. Expression of apoptosis-related proteins in endometriomas and benign and malignant ovarian tumours. *Virchows Arch.* 2003; 443:38-43.

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

Garcia-Velasco JA, Mulayim N, Kaysli UA, Arici A. Elevated soluble Fas ligand levels may suggest a role for apoptosis in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2002; 78:855-9.

Gebel HM, Braun DP, Tambur A, Frame D, Rana N, Dmowski WP. Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 1998; 69:1042-7.

Grivicich I, Regner A, Zanoni C, Correa LP, Jotz GP, Henriques JA, et al. Hsp70 response to 5-fluorouracil treatment in human colon cancer cell lines. *Int j Colorectal Dis.* 2007; 22:1201-8.

Gruenwald P. Origin of endometriosis from the mesenchyme of the celomic walls. *Am J Obstet Gynecol.* 1942; 44:470-4.

Gualco G, van den Berg A, Koopmans S, Bacchi LM, Carneiro SS, Ruiz E Jr, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome in a patient with a new minimal deletion in the death domain of the FAS gene. *Hum Pathol.* 2008; 39:137-41.

Guimarães CA, Linden R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem.* 2004 271:1638-50.

Halme J. Basic research in endometriosis. *Obstet Gynecol Annu.* 1985; 14:288-309.

Harada M, Suganuma N, Furuhashi M, Nagasaka T, Nakashima N, Kikkawa R, et al. Detection of apoptosis in human endometriotic tissues. *Mol Hum Reprod.* 1996; 2:307-15.

Harada M, Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Makrydimas G, Sofikitis N, et al. Apoptosis in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Update.* 2004; 10:29-38.

Harada T, Taniguchi F, Izawa M, Ohama Y, Takenaka Y, Tagashira Y, et al. Apoptosis and endometriosis. *Front Biosci.* 2007; 12:3140-51.

- Hassa H, Tanir HM, Tekin B, Artan S, Dundar E, Kirilmaz SD, et al. Apoptosis patterns in eutopic and ectopic endometrium adhesions and normal - looking peritoneum from women with or without endometriosis. *Arch Gynecol Obstet*. 2009; 280:195-9.
- Hassan S, Ferrario C, Mamo A, Basik M. Tissue microarrays: emerging standard for biomarker validation. *Curr Opin Biotechnol*. 2008; 19:19-25.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407:770-6.
- Henriksen E. Endometriosis. *Am J Surg*. 1955; 89:331-7.
- Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:277-88.
- Imai A, Tamaya T. GnRH receptor and apoptotic signaling. *Vitam Horm*. 2000; 59:1-33.
- Javert CT. Pathogenesis of endometriosis based on endometrial homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, lymphatic and hematogenous metastasis, including five cases report of endometrial tissue in pelvic lymph nodes. *Cancer*. 1949; 2:399-410.
- Jones RK, Searle RF, Bulmer JN. Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Hum Reprod*. 1998; 13:3496-502.
- 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.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26:239-57.
- Koh EA, Illingworth PJ, Duncan WC, Critchley HO. Immunolocalization of bcl-2 protein in human endometrium in the menstrual cycle and simulated early pregnancy. *Hum Reprod*. 1995; 10:1557-62.
- Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81:4144-7.
- Koninckx PR, Meuleman C, Demeyere C, Lesaffre E, Cornillie FJ. Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain. *Fertil Steril*. 1991; 55:759-65.
- Koninckx PR, Martin D. Treatment of deeply infiltrating endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1994; 6:231-41.
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998; 4:844-7.

Kratzer GL, Salvati EP. Collective review of endometriosis of the colon. *Am J Surg*. 1955; 90:866-9.

Lakhani SR, Ashworth A. Microarray and histopathological analysis of tumours: the future and the past? *Nat Rev Cancer*. 2001; 1:151-7.

Lansac J, Pierre F, Letessier E. Digestive endometriosis: results of a multicenter investigation. *Contrib Gynecol Obstet*. 1987; 16:192-204.

Lebovic DI, Muller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril*. 2001; 75:1-10.

Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol*. 1964; 10:643-9.

Longo LD. Classic pages in obstetrics and gynecology. Aberrant portions of the müllerian duct found in an ovary: William Wood Russell Johns Hopkins Hospital Bulletin, vol. 10, pp. 8-10, 1899. *Am J Obstet Gynecol*. 1979;134:225-6

Lyons SD, Chew SS, Thomson AJ, Lenart M, Camaris C, Vancaillie TG, et al. Clinical and quality-of-life outcomes after fertility-sparing laparoscopic surgery with bowel resection for severe endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol*. 2006; 13:436-41.

Macafee CH, Greer HL. Intestinal endometriosis. A report of 29 cases and a survey of the literature. *J Obstet Gynaecol Br Emp*. 1960; 67:539-55.

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

Matsumoto Y, Iwasaka T, Yamasaki F, Sugimori H. Apoptosis and Ki-67 expression in adenomyotic lesions and in the corresponding eutopic endometrium. *Obstet Gynecol*. 1999; 94:71-7.

McLaren J, Dealtry G, Prentice A, Charnock Jones DS, Smith SK. Decreased levels in the potent regulator of monocyte/macrophage activation, interleukin-13, in the peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Hum Reprod*. 1997; 12:1307-10.

Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M, Rumi L. Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2000; 74:760-6.

Meresman GF, Bilotas MA, Lombardi E, Tesone M, Sueldo C, Baraño RL. Effect of GnRH analogues on apoptosis and release of interleukin-1 beta and vascular endothelial growth factor in endometrial cell culture from patients with endometriosis. *Hum Reprod*. 2003; 18:1767-71.

Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavallaris M, Lock RB. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ*. 2000; 7:102-11.

Nadler W, Meinke JH, Hansmann UH. Folding proteins by first-passage-times-optimized replica exchange. *Physical Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*. 2008; 78:061905.

Naismith JH, Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci*. 1998; 23:74-9.

Nezhat RF, Kalir T. Comparative immunohistochemical studies of endometriosis lesions and endometriotic cysts. *Fertil Steril*. 2002; 78:820-4.

Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerises in vivo with a conserved homologue Bax that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993; 74:609-19.

Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR. Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril*. 1991; 56:45-51.

Osteen KG, Bruner-Tran KL, Eisenberg E. Reduced progesterone action during endometrial maturation: a potential risk factor for the development of endometriosis. *Fertil Steril*. 2005; 83:529-37.

Otsuki Y, Misaki O, Sugimoto O, Ito Y, Akao Y. Cyclic bcl-2 gene expression in human endometrium during human menstrual cycle. *Lancet*. 1994; 344:28-9.

Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H. Demystified...tissue microarray technology. *Mol Pathol*. 2003; 56:198-204.

Redwine DB, Koning M, Sharpe DR. Laparoscopically assisted transvaginal segmental resection of the rectosigmoid colon for endometriosis. *Fertil Steril*. 1996; 65:193-7.

Redwine DB, Wright JT. Laparoscopic treatment of complete obliteration of the cul-de-sac associated with endometriosis: long term follow-up of en bloc resection. *Fertil Steril*. 2001; 76:358-65.

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 PAA, Gagliardi AMM, Basbaum C, Kehdi IPA, Santos ET. Achados histológicos em mulheres portadoras de endometriose do septo retovaginal. In: 49º Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia. 2001, São Paulo [Tema Livre] São Paulo: FEBRASGO; 2001.

Ribeiro PAA, Rodrigues FC, Kehdi IP, Rossini L, Abdalla HS, Donadio N, et al. Laparoscopic resection of intestinal endometriosis: a 5-year experience. *J Minim Invasive Gynecol*. 2006; 13:442-6.

Richter BW, Mir SS, Eiben LJ, Lewis J, Reffey SB, Frattini A, et al. Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Mol Cell Biol.* 2001; 21:4292-301.

Ridley JH. The histogenesis of endometriosis. *Obstet Gynecol Surv.* 1968; 23:1-35.

Rogers PA, Lederman F, Plunkett D, Affandi B. Bcl-2, Fas and caspase 3 expression in endometrium from levonorgestrel implant users with and without breakthrough bleeding. *Hum Reprod.* 2000;15 (Suppl 3):152-61.

Romo Cabrera G, Prado González J, Venegas Soto-Aguilar LJ. Endometriosis en el servicio de Ginecología Hospital Carlos Van Buren. *Rev Med Valparaíso.* 1989; 42:29-34.

Rotello RJ, Lieberman RC, Lepoff RB, Gerschenson LE. Characterization of uterine epithelium apoptotic cell death kinetics and regulation by progesterone and RU 486. *Am J Pathol.* 1992; 140:449-56.

Samper ER, Slagle GW, Hand AM. Colonic endometriosis: its clinical spectrum. *South Med J.* 1984; 77:912-4.

Sampson JA. Perforating hemorrhagic (chocolate) cysts of the ovary, their importance and especially their relation to pelvic adenomas of endometrial types ("adenomyoma" of the uterus, rectovaginal septum, sigmoid) *Arch Surg.* 1921; 3:245-323.

Sampson JA. Intestinal adenomas of endometrial type. Their importance and their relation to ovarian hematomas of endometrial type (perforating hemorrhagic cysts of the ovary). *Arch Surg.* 1922; 5:217-80.

Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination to the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 1927; 14:422-69.

Sapino A, Marchiò C, Senetta R, Castellano I, Macrì L, Cassoni P, et al. Routine assessment of prognostic factors in breast cancer using a multicore tissue microarray procedure. *Virchows Arch.* 2006; 449:288-96.

Seli E, Arici A. Endometriosis: interaction of immune and endocrine systems. *Semin Reprod Med.* 2003; 21:135-44.

Sharpe-Timms KL. Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 943:131-47.

Sica G, Schinzari G, Angelucci C, Lama G, Iacopino F. Direct effects of GnRH agonists in human hormone-sensitive endometrial cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;176:121-8.

Siristatidis C, Nissotakis C, Chrelias C, Iacovidou H, Salamalekis E. Immunological factors and their role in the genesis and development of endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res.* 2006; 32:162-70.

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

Suganuma N, Harada M, Furuhashi M, Nawa A, Kikkawa F. Apoptosis in human endometrial and endometriotic tissues. *Horm Res*. 1997; 48 (Suppl.3): 42-7.

Sunderkötter C, Beil W, Roth J, Sorg C. Cellular events associated with inflammatory angiogenesis in the mouse cornea. *Am J Pathol*. 1991; 138:931-9.

Szymanowski K. Apoptosis pattern in human endometrium in women with pelvic endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2007; 132:107-10.

Tabibzadeh S, Zupi E, Babaknia A, Liu R, Marconi D, Romanini C. Site and menstrual cycle-dependent expression of proteins of the tumour necrosis factor (TNF) receptor family, and BCL-2 oncoprotein and phase-specific production of TNF alpha in human endometrium. *Hum Reprod*. 1995;10:277-86.

Tardif D, Poncelet C, Benifla JL, Madelenat P. Exploration paraclinique des endometrioses. *Rev Pract*. 1999; 49:263-8.

Terrano DT, Upreti M, Chambers TC. Cyclin-dependent kinase 1-mediated Bcl-xL/Bcl-2 phosphorylation acts as a functional link coupling mitotic arrest and apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2010; 30:640-56.

Ulukus M, Cakmak H, Arici A. The role of endometrium in endometriosis. *J Soc Gynecol Investig*. 2006; 13:467-76.

UNESP. Instituto de Biociências de Botucatu. Ciclo celular e mitose. [material didático on line] [citado em 10 fev 2010] Disponível em: www.ibb.unesp.br/departamentos/.../ciclo_celular_e_mitose.pdf

van de Rijn M, Gilks CB. Applications of microarrays to histopathology. *Histopathology*. 2004; 44:97-108.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 2000; 102:43-53.

Vignali M. Molecular action of GnRH analogues on ectopic endometrial cells. *Gynecol Obstet Invest*. 1998; 45(Suppl 1):2-5.

Watanabe H, Kanzaki H, Narukawa S, Inoue T, Katsuragawa H, Kaneko Y, et al. Bcl-2 and Fas expression in eutopic and ectopic human endometrium during the menstrual cycle in relation to endometrial cell apoptosis. *Am J Obstet Gynecol*. 1997; 176:360-8.

Weed JC, Arquembourg PC. Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? *Clin Obstet Gynecol*. 1980; 23:885-93.

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

Wieder T, Essmann F, Prokop A, Schmelz K, Schulze-Osthoff K, Beyaert R, et al. Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood*. 2001; 97:1378-87.

Williams C Jr. Endometriosis of the colon in elderly women. *Ann Surg*. 1963; 157:974-9.

Williams TJ, Pratt JH. Endometriosis in 1,000 consecutive celiotomies: incidence and management. *Am J Obstet Gynecol*. 1977; 129:245-50.

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

Zubor P, Hatok J, Galo S, Dokus K, Klobusiakova D, Danko J, Racay P. Anti-apoptotic and pro-apoptotic gene expression evaluated from eutopic endometrium in the proliferative phase of the menstrual cycle among women with endometriosis and healthy controls. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009; 145:172-6.

FONTES CONSULTADAS

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

Ferreira ABH. Aurélio século XXI: o dicionário da língua portuguesa. 3ª. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 1999. 2128p.

Garmer M, Delamare V. Dicionário Andrei de termos de medicina. 2ª ed. São Paulo: Andrei; 2002.

Houaiss A. Dicionário Houaiss da língua portuguesa. Rio de Janeiro: Objetiva; 2004.

Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa (VOLP), elaborado pela Academia Brasileira de Letras, em consonância com o novo Acordo Ortográfico(5ª edição, 2009. 976 Pgs.).

RESUMO

Análise dos fatores antiapoptóticos e pró-apoptóticos na endometriose pélvica e no endométrio normal. **Ribeiro, Helizabet Salomão Abdalla Ayroza.** [Tese] 2010.

A endometriose é definida como a presença de tecido com aspectos histológicos e funcionais semelhantes ao endométrio tópico fora de seu sítio habitual. Várias teorias são estudadas na tentativa de encontrar a causa da endometriose. A associação de quadro clínico e exames complementares se faz necessária na busca do diagnóstico. Os marcadores séricos são poucos específicos. Exames radiográficos, colonoscopia, ultrassonografia e laparoscopia são indicados para a avaliação da endometriose, além de maior entendimento da fisiopatologia da doença. Sendo assim, resolvemos estudar a interferência dos fatores antiapoptóticos e pró-apoptóticos na gênese da endometriose. A apoptose é um processo fisiológico que mantém o balanço entre a proliferação celular e a morte celular programada. **Objetivo:** Avaliar a presença de fatores antiapoptóticos, Bcl-2 e Ciclina D1, e pró-apoptóticos, Bax e APAF-1, na endometriose pélvica e no endométrio normal. Para isto, **Casística e Método:** Estudo observacional transversal em que selecionamos 40 mulheres entre 26 anos e 46 anos, portadoras de endometriose profunda, que não haviam sido tratadas clinicamente, no mínimo, nos três meses anteriores ao início da cirurgia, e submetidas à videolaparoscopia cirúrgica para tratamento da doença e coleta de fragmentos do peritônio, ligamento útero-sacro e retossigmoide, além da realização de curetagem de prova com cureta de Novak para biópsia endometrial, executadas pelo mesmo cirurgião. Assim, obtivemos material para análise anatomopatológica com confirmação da endometriose e também para análise imunoistoquímica. **Resultados:** O fator antiapoptótico Bcl-2 está em menor quantidade no endométrio e ligamento útero-sacro ($p=0.007$) que no peritônio e intestino. Outro fator antiapoptótico, Ciclina D1, está em menor quantidade no peritônio e ligamento útero-sacro, se comparada ao endométrio e intestino. Porém, a análise da Bax mostrou que apenas o ligamento útero-sacro apresentou expressão desta proteína, sendo 1 caso (2,5%) positivo e 97,5%, negativo. Analisando a proteína Apaf-1, observamos positividade de 13 casos (32,5%) no peritônio, de 8 casos (20%) no ligamento útero-sacro e de 16 casos (40%) no intestino. **Conclusão:** Os fatores antiapoptóticos Bcl-2 e Ciclina D1 apresentam expressão significativa no endométrio e nos fragmentos de tecido endometriótico estudado. O fator pró-apoptótico Bax apresenta expressão praticamente nula em todos os tecidos estudados e o fator pró-apoptótico Apaf -1 apresenta expressão variável nos tecidos estudados; o fator antiapoptótico Bcl-2 apresenta maior expressão no ligamento útero-sacro que no endométrio. A expressão da Ciclina D1 nos fragmentos de ligamento útero-sacro foi superior à expressão da Bax e Apaf - 1 e, ainda, a expressão da Ciclina D1 nos fragmentos de intestino foi superior à expressão da Apaf-1.

Palavras chave: 1. Endometriose/fisiopatologia 2. Endometriose/etiologia
3. Laparoscopia 4. Apoptose 5. Imunoistoquímica/métodos

ABSTRACT

Analysis of anti-apoptotic and pro-apoptotic factors in pelvic endometriosis and in normal endometrium. Ribeiro, Helizabet Salomão Abdalla Ayroza. [Tesis]. 2010.

Endometriosis is defined as the presence of tissue with histological and functional characteristics similar to the topic endometrium, outside their usual site. Various theories were studied in an attempt to find the cause of endometriosis. The association of clinical symptoms and radiologic investigation is needed in the search for a precise diagnosis. It is emphasized the importance of deepening our knowledge of the pathophysiology of the disease. Apoptosis is a physiological process that maintains the balance between cell proliferation and programmed cell death. With this premise, we studied the interference of anti-apoptotic factors and pro-apoptotic in the pathogenesis of endometriosis. **Purpose:** To evaluate the presence of anti-apoptotic factors, Bcl-2 and Ciclina D1, and pro-apoptotic factors Bax e Apaf-1 in pelvic endometriosis and normal endometrium. **Methods:** Transversal study including 40 patients aged between 26 and 46 years, with deep endometriosis, without clinical treatment for at least 3 months before the surgery. The patients were submitted to laparoscopic surgery for endometriosis treatment and sample obtainment of peritoneum, uterosacral ligament and bowel. The endometrial samples were obtained with a Novak catheter from the endometrium. All the procedures were performed by the same surgeon. Material to the anatomic pathologic analysis was obtained to confirm endometriosis and to the immunohistochemical staining of the following antibodies: Bcl2, Bax, Ciclina D1 and Apaf-1 were investigation. **Results:** The anti-apoptotic factor Bcl2, was decreased in the endometrium and uterosacral ligament ($p=0.007$) when compared with peritoneum and bowel. The anti-apoptotic factor Ciclina D1 was decreased in the peritoneum and útero sacral ligament when compared with endometrium and bowel. Furthermore, the analisys of the pro-apoptotic factor Bax, was evident only the utero-sacral ligament. There was only one positive case (2.5%) and 39 negative ones (97.5%). The analisys of pro- apoptotic factor Apaf-1 showed positivity in the peritoneum in 13 cases (32.5%), uterosacral ligament in 8 cases (20%) and bowel in 16 cases (40%). The relative optical density analysis demonstrated a significant difference when comparing all investigated factors and biopsy localization. **Conclusion:** The anti-apoptotic factor Bcl-2 and Ciclina D1 showed significant expression in the endometrium, and in the endometriotic fragment tissue. The pro-apptotic factor Bax showed absent expression in all the studied tissues. The pro-apoptotic factor Apaf-1 showed variable expression in the studied tissues, whereas the anti-apoptotic factor Bcl-2 had a higher expression in utero sacral ligament when compared with endometrium. The expression of Ciclina D1 in the utero sacral ligament fragment was higher when compared with the expression of Bax and Apaf-1. The expression of Ciclina D1 in bowel fragments was higher when compared with Apaf-1. There were differences in the mean relative optical density of all the factors studied, comparing the endometrium with the peritoneum, utero-sacral ligament and intestine.

Key words: Endometriosis /physiopathology/ etiology; Laparoscopy; Apoptosis; Immunohistochemistry /methods.

APÊNDICE

APÊNDICE

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de São Paulo



IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
Rua Santa Isabel, 305 – 4º andar Santa Cecília CEP 01221-010 São Paulo –SP
Fone Fax- 3337-0188 E-mail: eticamed@santacasasp.org.br

São Paulo, 05 de novembro de 2007.

Projeto nº 392/07
Informe este número para
identificar seu projeto no CEP

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

Dra. Helizabet Salomão Abdalla Ayrosa Ribeiro
Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

O Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMSP, em reunião ordinária, dia **26/09/2007** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa: **"Estudo de expressão dos fatores envolvidos no processo de apoptose em tecidos de mulheres portadoras de endometriose superficial e profunda."** emitiu parecer inicial em pendência e nesta data enquadrando-o na seguinte categoria:

☒ **Aprovado (inclusive TCLE) ;**

☐ **Com pendências** (há modificações ou informações relevantes 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 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. Nelson Keiske Ono

Vice-Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa - ISCMSP

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](#)