

# Análise do grau de diferenciação histológica e da imunoexpressão da BCL 2 e a ciclina D1 em mulheres portadoras de endometriose profunda

Analysis of the histological degree of differentiation and immunostaining of BCL 2 and cyclin D1 in women with deep endometriosis

Helizabet Salomão Abdalla Ayroza Ribeiro<sup>1</sup>, Rodrigo Fernandes<sup>2</sup>, Maria Antonieta Longo Galvão<sup>3</sup>, José Mendes Aldrighi<sup>4</sup>, Paulo Augusto Ayroza Galvão Ribeiro<sup>5</sup>

## Resumo

A endometriose é uma das doenças ginecológicas mais estudadas na atualidade. Muito dessas pesquisas são dedicadas a etiopatogenia da doença, assim como sua evolução, pois até os dias de hoje não se sabe quais seriam seus fatores decisivos. A apoptose é um fator importante já que noventa por cento das mulheres apresentam refluxo menstrual. Qualquer ponto desregulado da morte celular pode levar a instalação de células endometrióticas na cavidade pélvica e abdominal. A BCL-2 e a Ciclina D1 são proteínas anti apoptóticas que já foram identificadas em implantes de pacientes com endometriose. O grau de diferenciação histológica está diretamente ligado a gravidade da doença. Neste estudo procuramos avaliar a relação entre a expressão destas proteínas com o grau de diferenciação histológica em pacientes portadoras de endometriose profunda, com acometimento de peritônio, ligamento útero-sacro e intestino.

**Descritores:** Endometriose, Genes *bcl-2*, Ciclina D1, Apoptose

## Abstract

Endometriosis is one of the gynecological disease most studied today. Much of this research is devoted to pathogenesis of the disease and its evolution since until this day no one knows what would be its decisive factors. Apoptosis is an important factor since ninety percent of women experience menstrual reflux. Any point of deregulated cell death can lead to installation of endometriotic cells in abdominal and pelvic cavity. The BCL-2 and Cyclin D1 are anti apoptotic proteins already identified in patients with endometriosis implants. The degree of histological differentiation is directly linked to disease severity. In this study we evaluated the relationship between the expression of these proteins with the degree of histological differentiation in patients with deep endometriosis.

**Keywords:** Endometriosis; Genes, *bcl-2*; Cyclin D1, Apoptosis

## Introdução

A endometriose é uma doença ginecológica caracterizada pela presença de tecido endometrial, seja ele glandular ou estromal, fora da cavidade uterina. Primeiramente relatada em 1860 na Áustria pelo patologista von Rokitansky\* citado por Umária, Olliff<sup>(1)</sup>, a endometriose foi amplamente estudada por outros autores<sup>(2,3)</sup>, os quais descreveram a presença de tecido semelhante ao endométrio em útero, ovário, tuba uterina, ligamento redondo, ligamento útero-ovário, ligamento útero-sacro, septo retovaginal, parede de reto e sigmoide, músculo retoabdominal e na cicatriz umbilical<sup>(4)</sup>. Muito da sua velocidade de progressão e locais

1. Assistente da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Departamento de Obstetrícia e Ginecologia. Setor de Endoscopia Ginecológica

2. Pós Graduando da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo Departamento de Obstetrícia e Ginecologia. Setor de Endoscopia Ginecológica

3. Professor Adjunto da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Departamento de Ciências Fisiológicas

4. Diretor da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

5. Chefe da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Departamento de Obstetrícia e Ginecologia. Setor de Endoscopia Ginecológica

**Trabalho realizado:** Setor de Endoscopia Ginecológica. Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

**Endereço para correspondência:** Helizabet Salomão Abdalla Ayroza Ribeiro. Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo - Departamento de Obstetrícia e Ginecologia. Rua Dr. César Motta Jr, nº 112 - Vila Buarque - 01224-020 - São Paulo - SP - Brasil. Telefone: (011) 2176. 7000 / Ramal: 7384

\* von Rokitansky APUD Umária N, Olliff JF. Imaging features of pelvic endometriosis. Br J Radiol. 2001; 74:556-62<sup>(1)</sup>.

de acometimento são dependentes do balanço entre o estímulo estrogênico e o sistema imune da mulher.

A prevalência da endometriose varia dependendo da população estudada. Seu pico de incidência ocorre aos 40 anos<sup>(5)</sup>, mas pode estar presente em todas as idades do período reprodutivo. Em mulheres assintomáticas o diagnóstico variou entre 2% e 22%<sup>(6)</sup>. Naquelas sob investigação de infertilidade ocorre em 21% a 40%<sup>(7)</sup>, nas que se submetem a ligadura tubárea em 3% a 43%; entre as pacientes que investigam dor pélvica, em 15% a 60% e, em pacientes submetidas à histerectomia, em 25%<sup>(3,8,9)</sup>.

Uma das mais antigas teorias e, talvez a mais difundida para o aparecimento dos implantes endometriais foi descrita por Sampson em 1927<sup>(10)</sup>. Ele observou o comportamento da doença que apresentava tecido endometrial semelhante ao tecido típico na escavação retouterina, as vezes entre aderências que, dependendo do seu grau de progressão uniam o reto a parte inferior da cérvice uterina. Assim, descreveu sua tese sobre o refluxo menstrual e o implante nos órgãos pélvicos<sup>(10-12)</sup>.

Inúmeras outras teorias foram propostas para o aparecimento do tecido endometrial ectópico. Entre elas a teoria da metaplasia celômica na qual os focos de endometriose desenvolviam-se a partir da metaplasia do epitélio celômico pluripotencial<sup>(13,14)</sup> associando-se a várias teorias antes descritas como a do refluxo menstrual, disseminação por contiguidade nos órgãos adjacentes, hematogênica e linfática<sup>(15)</sup>. O estresse oxidativo parece influenciar na fisiopatologia da endometriose que em seu processo inflamatório gera radicais livres e, associado a falta de antioxidantes séricos parece favorecer a progressão da doença<sup>(6)</sup>.

Ainda assim, hoje, credita-se que muitas destas teorias descritas estejam associadas a um fenômeno imunológico sistêmico e local peritoneal, pela evolução e pelas lesões causadas pela endometriose<sup>(17-19)</sup>.

O fenômeno imunológico está fundamentado na teoria de que durante o período menstrual as células endometrióticas que atingem os órgãos pélvicos além de estarem programadas para a apoptose proporcionada pela progesterona, induzem a mobilização de células do sistema imune que representadas principalmente por macrófagos, destruindo estas células. Uma alteração nesse mecanismo causaria a deficiência no combate macrofágico aos implantes endometriais facilitando a propagação dos mesmos<sup>(20)</sup>. Assim cada vez mais, acredita-se que haja um perfil imunológico individual<sup>(21)</sup> associado a fatores angiogênicos e genéticos envolvidos nesta doença<sup>(22)</sup>.

## Diagnóstico

A mulher com endometriose representa um desa-

fio quanto ao diagnóstico. Quadro clínico minuciosamente detalhado associado a exames complementares são armas importantes. Marcadores séricos, exames radiográficos, colonoscopia, ultrassonografia transvaginal e laparoscopia fazem parte do arsenal utilizado. Com a evolução dos meios diagnósticos como ressonância magnética pélvica e endossônografia intestinal, a avaliação da doença extensa, com infiltração profunda ultimamente tornou-se mais fácil, mas ainda um desafio na condução da paciente<sup>(30)</sup>.

## Morfologia

Infelizmente o diagnóstico clínico de certeza da endometriose não existe e um procedimento invasivo se impõe, uma vez que ainda não dispomos de um marcador biológico 100% específico<sup>(23)</sup>. Assim sendo, o diagnóstico da endometriose deve ser anátomo patológico ou laparoscópico quando bem documentado<sup>(23)</sup>. No início das descrições, as lesões típicas com aparência enegrecida eram as únicas relacionadas à endometriose. A partir da década de 80, foram descritas novas lesões que foram caracterizadas como atípicas e que se associavam a maior atividade da doença. Dentre estas lesões foram incluídas as falhas peritoneais<sup>(23,24)</sup>, opacidade esbranquiçada ou placas brancas do peritônio, com ou sem espessamento; excrescências glandulares na superfície do peritônio que, em cor, translucência e consistência, assemelham-se ao endométrio normal; lesões vermelhas do tipo “chama de vela” no peritônio; aderências que ocorrem sem motivo aparente entre ovário e fossa ovarica<sup>(25)</sup> e áreas de hiper-vascularização como relacionadas às lesões atípicas<sup>(26)</sup>. O grau de evolução das lesões varia de vesícula não pigmentada, transparente, passando para vesícula rósea avermelhada, marrom clara, marrom escura, enegrecida, e, por fim, lesão branca fibrótica. Considerando-se o grau de infiltração, as lesões podem ser consideradas superficiais, quando a invasão é < 1mm, intermediárias, entre 2 e 4mm, e profundas, [quando a invasão é] > 5mm<sup>(27)</sup>.

Estudos mostraram que seriam necessários de 4 a 10 anos para que a lesão inicial progrida para lesão cicatricial de aspecto escuro<sup>(25)</sup>. A publicação de Jansen, Russell (1986)<sup>(25)</sup> mostrou 6 casos, acompanhados sem qualquer tipo de tratamento, de lesões não pigmentadas progredindo para lesões típicas pigmentadas em prazos de 6 a 24 meses, confirmando a existência de um “*continuum biológico*” entre as lesões não pigmentadas e pigmentadas. Esta sequência de evolução seguiria de forma inversa à atividade mitótica da endometriose. O largo espectro de anormalidades histológicas peritoneais, associadas à progressão da lesão não pigmentada para a pigmentada, parece reforçar a teoria de Meyer<sup>(29)</sup> que sugeriu a existência da meta-

plasia serosa em oposição à teoria da implantação de Sampson<sup>28</sup>, na gênese da endometriose peritoneal<sup>(29,30)</sup>.

## Endometriose pélvica profunda

A determinação da profundidade é de suma importância na avaliação dos focos endometrióticos. Eles são considerados proliferativos na presença de mitoses do tecido epitelial ou estromal e/ou acúmulo de glicogênio e considerados inativos na ausência de qualquer diferenciação epitelial ou na substituição do estroma por fibrose. O estudo de Cornillie et al (1990)<sup>(31)</sup>, avaliando o grau de infiltração dos focos obtiveram resultados onde 17% foram superficiais ( $\leq 1$ mm), 35% foram intermediários (2 a 4mm) e 48% foram profundos ( $> 5$ mm). Os autores demonstraram que a endometriose profunda é uma doença com intensa atividade e com ciclicidade semelhante à do endométrio tópico, enquanto os implantes superficiais também apresentam bastante atividade, mas sem a mesma ciclicidade. A partir deste estudo, Cornillie et al<sup>(31)</sup> sugeriram a conceituação de que a endometriose pélvica profunda (EPP) é definida como a existência de lesões com penetração em profundidade igual ou superior a 5 mm a partir da superfície do peritônio. Acredita-se que cerca de 7% das pacientes portadoras de endometriose apresentem a doença em sua forma profunda<sup>(32)</sup>. O mesmo autor observou locais mais comuns de acometimento como a região retro-cervical, os ligamentos útero-sacrais, o septo retovaginal e menos freqüentemente a prega útero vesical, pois são locais que apresentam tecido conectivo frouxo.

Assim, as lesões podem ser consideradas superficiais, quando a invasão é  $< 1$ mm, intermediárias, entre 2 e 4mm, e profundas, quando a invasão é  $> 5$ mm. No estudo de Cornillie et al (1990)<sup>(31)</sup>, avaliando a atividade celular dos implantes endometrióticos, 58% dos implantes superficiais e 68% dos implantes profundos apresentaram atividade celular, enquanto as lesões intermediárias, em apenas 25% dos implantes. Estes mesmos autores observaram que a frequência da distribuição das lesões profundas em mulheres com dor e/ou infertilidade, é claramente bifásico com o ápice entre 5 e 6mm. Portanto, na maioria das mulheres as lesões são superficiais e ativas, tornando-se inativas no início da infiltração, e novamente ativas e progressivas com infiltração maior que 5mm.

## Apoptose

A morte e a proliferação celular são gerenciadas por um fenômeno não inflamatório<sup>(33)</sup> e não imune, conhecido como morte celular programada<sup>(34)</sup>. A apoptose, como também é conhecida, induz a morte celular através da diminuição de fatores de crescimento e um

aumento nos fatores de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )<sup>(35)</sup>.

Existem duas maneiras distintas da programação apoptótica. A via extrínseca é responsável por ligantes no citoplasma da célula ativando os receptores de morte específicos<sup>(36)</sup>. A via intrínseca ou mitocondrial responde as alterações por estresse intracelular ou extracelular como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes<sup>(37)</sup>. Assim, aumenta a sua permeabilidade facilitando proteínas pró apoptóticas a atingirem o citoplasma e ativar a morte celular<sup>(38)</sup>.

Este mecanismo de apoptose via mitocondrial, gerenciado pelo gene Bcl-2 é responsável pela produção de duas proteínas. 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.

A endometriose pode-se apresentar de diferentes formas. Autores primeiramente dividiram a mesma em central, quando acometia o útero, bexiga e septo retovaginal<sup>(39)</sup>, e lateral, quando atingia peritônio e/ou ovários.

A análise da morfologia é de suma importância para definir o grau de extensão da doença. Macroscopicamente os implantes podem ser polipóides com invasão do tecido subperitoneal, císticos ou com lesões que apresentem fibrose e inflamação<sup>(40)</sup>.

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*) conseguem bloquear a cascata de ativação de caspases e inibir a apoptose<sup>(41)</sup>. 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)<sup>(42)</sup>. A **Bcl-2** é uma proteína anti-apoptótica que, em conjunto com a Bax, 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<sup>(43)</sup>.

Quando a concentração de Bax é superior à de Bcl-2, 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<sup>(44)</sup>. 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 externa da mitocôndria que, em contrapartida,

ativa a caspase 9 e, subsequentemente, a apoptose<sup>(45)</sup>.

## Objetivo

Avaliar o grau de diferenciação histológica e sua correlação com a imunexpressão da BCL 2 e da ciclina D1 em mulheres com endometriose profunda.

## Casuística e métodos

Realizamos um estudo observacional transversal aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. No recrutamento, foram diagnosticadas e tratadas 170 pacientes com diagnóstico de endometriose pélvica. Dentre estas, foram selecionadas 42 pacientes portadoras de endometriose pélvica profunda, que satisfizeram nossos critérios de inclusão e exclusão. 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)

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.

## Crterios de inclusão e exclusão

Incluimos 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.

## 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 de 23,1.

## Métodos

### Tissue Microarray (TMA).

Na técnica de TMA (*Tissue Microarray*) 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<sup>(46-48)</sup>; e está descrita no Anexo 2.

### Análise histopatológica

Após fixação em solução de formaldeído tampornado 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) 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.

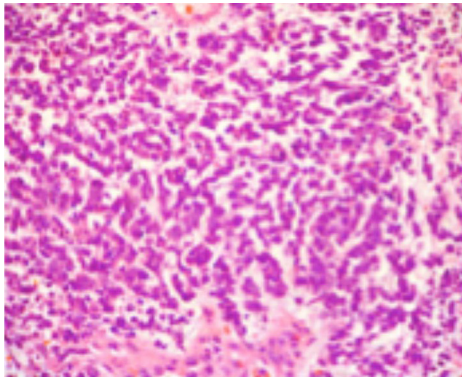
Aplicaram-se neste estudo os seguintes critérios histológicos para o diagnóstico de endometriose:

Presença de tecido glandular de padrão mülleriano, associado a sinais de hemorragia e fibrose.

Estroma de padrão endometrióide com morfologia de qualquer período do ciclo menstrual, associado ou não a hemorragia e fibrose, com ou sem elementos glandulares.

Após o diagnóstico de endometriose, procedemos à classificação morfológica da lesão, considerando-se as variações de aspecto das estruturas endometriais ectópicas<sup>39</sup>

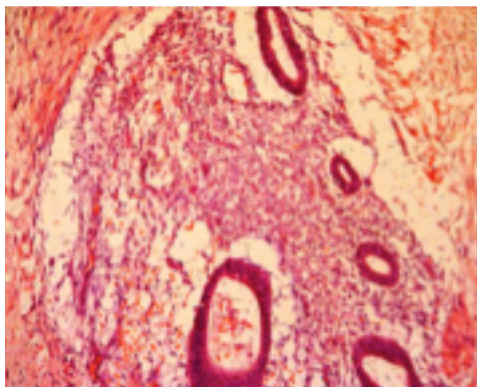
- Endometriose Estromal: presença de estroma morfológicamente similar ao do endométrio tópico em qualquer fase do ciclo ( Fig 1)
- Endometriose glandular: presença de epitélio, superficial ou constituindo espaços glandulares ou císticos, associado a tecido com sinais de hemorragia prévia, caracterizada pela presença



**Figura 1** - Endometriose Estromal. Coloração de hematoxilina e eosina (HE), 400x.

de hemossiderófagos e fibrose. Este padrão é subclassificado, segundo a similaridade com epitélio endometrial ativo, nas seguintes formas de apresentação:

- Bem diferenciada: células epiteliais tem morfologia indistinguível dos endométrios tópicos nas diferentes fases do ciclo ( Fig. 2)



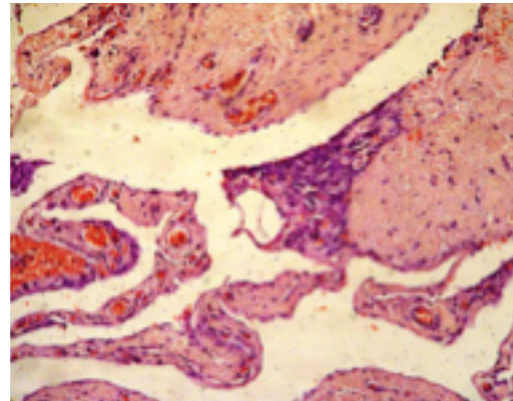
**Figura 2** - Endometriose glandular bem diferenciada. Coloração hematoxilina e eosina (HE), 400x.

- Indiferenciada: epitélio é aplainado ou cuboidal baixo, sem correspondente endometrial tópico, assemelhando-se ao mesotélio do revestimento peritoneal, ou epitélio é de tipo mulleriano, seroso ou mucinoso, distinto do endometrióide. [ como seroso ou mucinoso] (Fig.3)
- Diferenciação mista: presença, na mesma localização, de padrões diferenciados e indiferenciados (Fig.4)

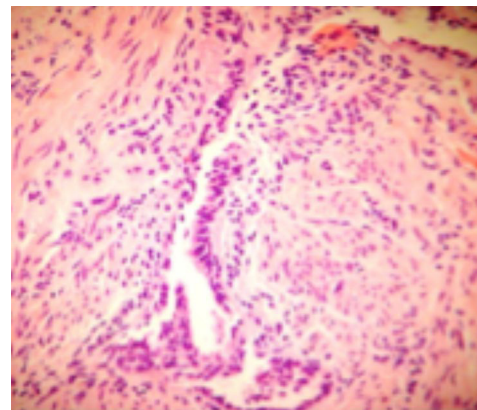
Todos os casos foram selecionados para a confecção do arranjo tecidual em matriz, consagradamente conhecido como *tissue microarray* (TMA).

#### Estudo imunoistoquímico

Na análise da imunoistoquímica foram avaliadas as expressões dos seguintes anticorpos monoclonais, Bcl-2 e Ciclina D1. A técnica imunoistoquímica utili-



**Figura 3** - Endometriose glandular indiferenciada. Coloração hematoxilina e eosina (HE), 400x.



**Figura 4** - Endometriose glandular mista. Coloração hematoxilina e eosina (HE), 400x.

zada no presente estudo foi realizada no Serviço de Anatomia Patológica da ISCMSP, seguindo técnicas-padrão de nossa instituição.

Os cortes foram incubados com os anticorpos primários preparados em solução previamente otimizada de Bcl-2, Ciclina D1. 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 que utilizados nas reações imunoistoquímicas foram: Bcl-2 (anticorpos monoclonais) clone 124 DAKO®; Ciclina D1 (anticorpos monoclonais) clone AM-29.

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.

Os critérios para classificarmos a expressão imunistoquímica da Bcl-2, Ciclina D1 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 (Tabela 1)<sup>(49)</sup>.

Tabela 1		
Padrão de imunomarcção	Pontuação	Conclusão Imunoposição
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

#### Avaliação semiquantitativa da imunomarcção por ROD (Relative Optical Density)

Após a avaliação imunistoquímica dos fatores antiapoptóticos, (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).

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).

#### 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 29 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, procederemos à análise descritiva dos dados encontrados e sua tabulação.

Para análise da idade e índice de massa corpórea, foi calculada 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%).

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

#### Resultados

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

Observamos que a análise da frequência da imunoposição 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 18 (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 imunoposição 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. 5).

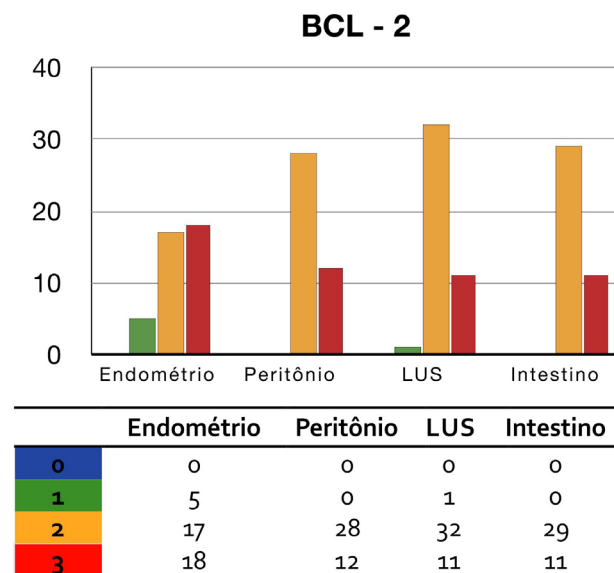


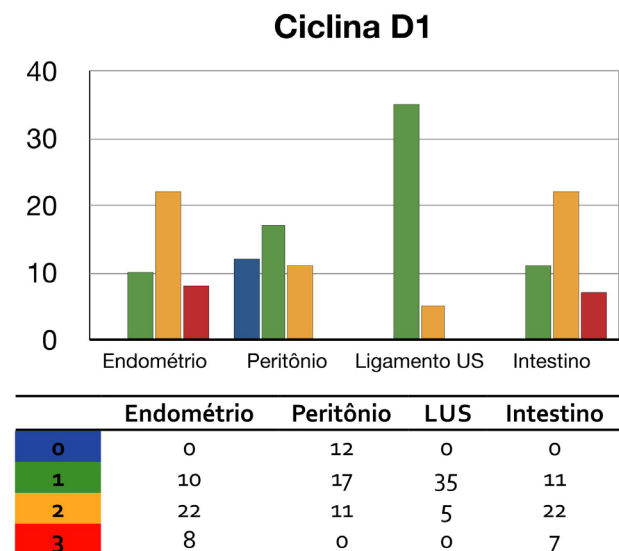
Figura 5 - Representação do escore imunistoquímico da proteína Bcl-2 no endométrio e em fragmentos de tecidos de mulheres portadoras de endometriose pélvica.

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

No endométrio, a imunoposição 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 (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. 6).



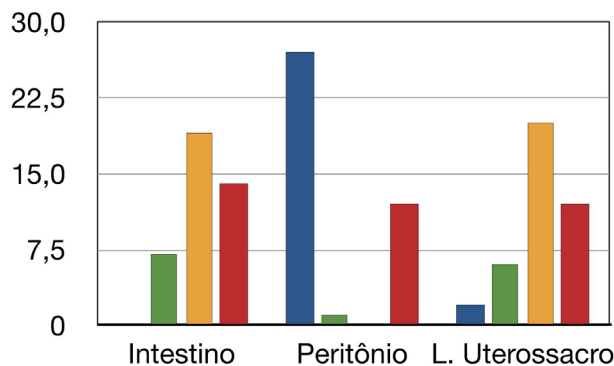
**Figura 6** - Representação do escore imunistoquímico da proteína Ciclina D1 no endométrio e em fragmentos de tecidos de mulheres portadoras de endometriose pélvica.

A análise dos padrões histológicos demonstrou os seguintes resultados: no intestino encontramos o padrão bem diferenciado em sete pacientes 7 (16,6%), padrão misto em vinte e um pacientes 21 (50%) e padrão glandular indiferenciado em quatorze pacientes 14 (33,3%). Quando avaliado o peritônio encontramos padrão estromal em vinte e nove pacientes 29 (69%), glandular bem diferenciado em uma paciente 1 (2,5%) e glandular bem diferenciado em doze pacientes 12 (28,5%). (Fig. 7). Já na análise do ligamento uterossacro encontramos padrão puramente estromal em duas pacientes 2 (5%), bem diferenciado em seis pacientes 6 (15%), padrão misto em vinte pacientes 20 (50%) e indiferenciado em doze pacientes 12 (30%).

## Discussão

O presente estudo teve como propósito avaliar a correlação entre a expressão dos fatores anti apoptóticos BCL - 2 e Ciclina D1 com os padrões histológicos encontrados nas biópsias realizadas.

O fenômeno imunológico sistêmico e local vem



	Intestino	Peritônio	LUS
Estromal	0	27	2
Glandular bem diferenciada	7	1	6
Mista	19	0	20
Glandular indiferenciada	14	12	12

**Figura 7** - Representação da distribuição segundo a classificação dos tipos de implantes encontrados nas amostras biopsiadas.

sendo motivo de inúmeros estudos, assim como a evolução e lesões causadas pela endometriose<sup>(18-20)</sup>.

A expressão dos fatores antiapoptóticos varia com a localização do mesmo<sup>(50)</sup>. Nezhat e Khalir demonstraram uma expressão diminuída da BCL - 2 em lesões císticas em comparação a não císticas. No peritônio e no intestino Belliard et al<sup>(51)</sup> demonstraram um aumento na expressão da proteína BCL - 2 em relação ao endométrio.

Abdalla Ribeiro em 2010 demonstrou aumento na expressão de BCL - 2 em locais como ligamento uterossacro, e de Ciclina D1 em comparação com fatores pró apoptóticos<sup>(52)</sup>.

A diferenciação histológica em endometriose profunda foi relacionada com um pior prognóstico. Pacientes que apresentavam lesões indiferenciadas associavam-se a estadios mais avançados como III e IV<sup>(53)</sup>.

Kamergorodsky et al em 2009<sup>(54)</sup> observaram que as os padrões histológicos glandulares bem diferenciados correlacionavam-se em maior frequência as lesões superficiais e que os padrões indiferenciados correlacionavam-se mais com lesões profundas.

A correlação destes dados pode trazer a relação positiva entre as altas taxas de fatores anti apoptóticos e a evolução para a endometriose de pior prognóstico podendo assim estabelecer uma forma de antecipar a doença agressiva.

## Conclusão

Encontramos neste estudo a alta prevalência de

implantes endometrióticos mistos seguidos de indiferenciados e de bem diferenciados com ausência de padrões puramente estromais no intestino.

Nos implantes peritoniais a alta prevalência de padrão estromal com seguido por implantes indiferenciados, poucos implantes bem diferenciados, e ausência de implantes mistos.

No ligamento uterossacro encontramos a grande maioria dos implantes mistos, seguidos de implantes indiferenciados e poucos implantes bem diferenciados e puramente estromais.

## Referências Bibliográficas

1. Umariá N, Olliff JF. Imaging features of pelvic endometriosis. *Br J Radiol*. 2001;74:556-62.
2. Ridley JH. The histogenesis of endometriosis. *Obstet Gynecol Surv*. 1968; 23:1-35.
3. Samper ER, Slagle GW, Hand AM. Colonic endometriosis: its clinical spectrum. *South Med J*. 1984; 77:912-4.
4. Cullen TS. The distribution of adenomyomas containing uterine mucosa. *Arch Surg*. 1920; 12:15-83.
5. Vessey MP, Villard Machintosh L, Painter R. Epidemiology of endometriosis in women attending family planning clinics. *BMJ*. 1993; 306:182-4.
6. Murphy AA. Clinical aspects of endometriosis *N Y Acad Sci*. 2002; 955: 1-10.
7. Child TJ, Tan SL. Endometriosis: aetiology, pathogenesis and treatment. *Drugs*. 2001; 61:1735-750.
8. D'Hooge TM, Hill JA. Endometriose. In: Berek JS. *Berek Berek & Novak tratado de ginecologia*. 14ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 842-76.
9. Royal College of Obstetricians and Gynecologists. The investigation and management of endometriosis. Green top Guideline nº 24. October 2006. [on line] [Access 2012 Aug 5]. Available from: <http://www.rcog.org.uk>
10. 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.
11. 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.
12. Sampson JA. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination to the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol*. 1927; 14:422-69.
13. Gruenwald P. Origin of endometriosis from the mesenchyme of the celomic walls. *Am J Obstet Gynecol*. 1942; 44:470-4.
14. 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.
15. 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.
16. Amaral VF, Sanson LT, Sepulcri RP. Novas perspectivas no tratamento da endometriose pélvica. *Femina*. 2006; 34:189-96.
17. 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.
18. Weed JC, Arquembourg PC. Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? *Clin Obstet Gynecol*. 1980; 23:885-93.
19. Steele RW, Dmowski WP, Marmer DJ. Immunologic aspects of human endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 1984; 6:33-6.
20. 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.
21. Siristatidis C, Nissotakis C, Chrelia 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.
22. Seli E, Arici A. Endometriosis: interaction of immune and endocrine systems. *Semin Reprod Med*. 2003; 21:135-44.
23. Safe Jr JV, Safe GMS. Endometriose. In: Crispi CP, Oliveira FMM, Damin Jr JC, Oliveira MAP. *Tratado de videoendoscopia e cirurgia minimamente invasiva em ginecologia*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2007. p.294-327.
24. Chatman DL. Pelvic peritoneal defects and endometriosis: Allen-Masters Syndrome Revisited. *Fertil Steril*. 1981; 36:751-6.
25. Jansen RP, Russell P. Nonpigmented endometriosis: clinical laparoscopic and pathologic definition. *Am J Obstet Gynecol*. 1986; 155:1154-7.
26. Donnez J, Nisolle M, Casanas-Roux F. Three dimensional architectures of peritoneal endometriosis. *Fertil Steril*. 1992; 57:980-3.
27. American Fertility Society. Revised American Fertility Society Classification of endometriosis. *Fertil Steril*. 1985; 43:351-352.
28. Sampson JA. Heterotopic or misplaced endometrial tissue. *Am J Obstet Gynecol*. 1925; 10:649-64.
29. Meyer R. Ueber den stand den frage der adenomyositis und adenomyome in allgemeinen und insbesondere ueber adenomyositis seroepithelialis und adenomyometritis sacromatosa. *Zentrabl Gynakol*. 1919; 43:745-50.
30. Kamergorodsky G, Ribeiro PAA. Histologic classification of specimens from women affected by superficial endometriosis, deeply infiltrating endometriosis, and ovarian endometriomas. *Fertil Steril*. 2009;92:2074-7.
31. Cornillie FJ, Osterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx PR. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril*. 1990; 53:978-83.
32. Santos ET, Ribeiro PAG, Gagliardi AMM, Basbaum C, Kehdi IPA. Endometriose avançada: abordagem clínico cirúrgica. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2001; 23:TLPG 349.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. Naismith JH, Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci*. 1998; 23:74-9.
37. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407:770-6.
38. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*. 2000; 10:369-77.
39. Abrão MS, Neme RM, Carvalho FM, Adrighi JM, Pinotti JA. Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. *Int J Gynaecol Obstet* 2003; 82:31-40.
40. Carvalho FM, Abrão MS. Histopatologia da endometriose: a importância da interação entre o ginecologista e o patologista. In: Abrão MS. *Endometriose: uma visão contemporânea*. São Paulo: Revinter; 2000. p. 35-44.



41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärnlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998; 4:844-7.
47. Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H. Demystified...tissue microarray technology. *Mol Pathol*. 2003; 56:198-204.
48. 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.
49. Farias RE, 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.
50. Nezhat FR, Kalir T. Comparative immunohistochemical studies of endometriosis lesions and endometriotic cysts. *Fertil Steril*. 2002; 78:820-4.
51. Belliard A, Noel A, Foidart JM. Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertil Steril*. 2004; 8:80-5.
52. Abdalla Ribeiro HAS. Analysis of anti-apoptotic and proapoptotic factors in pelvic endometriosis and in normal endometrium, 2010. (In Press)
53. 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
54. Kamergorodsky G, Ribeiro PAA, Galvão MAL, Abrão MS, Doando N, Lemos NLBM, et al. Histologic classification of specimens from women affected by superficial endometriosis, deeply infiltrating endometriosis, and ovarian endometriomas. *Fertil Steril*. 2009; 92:2074-7.

---

Trabalho recebido:18/10/2012

Trabalho aprovado:12/12/2012