

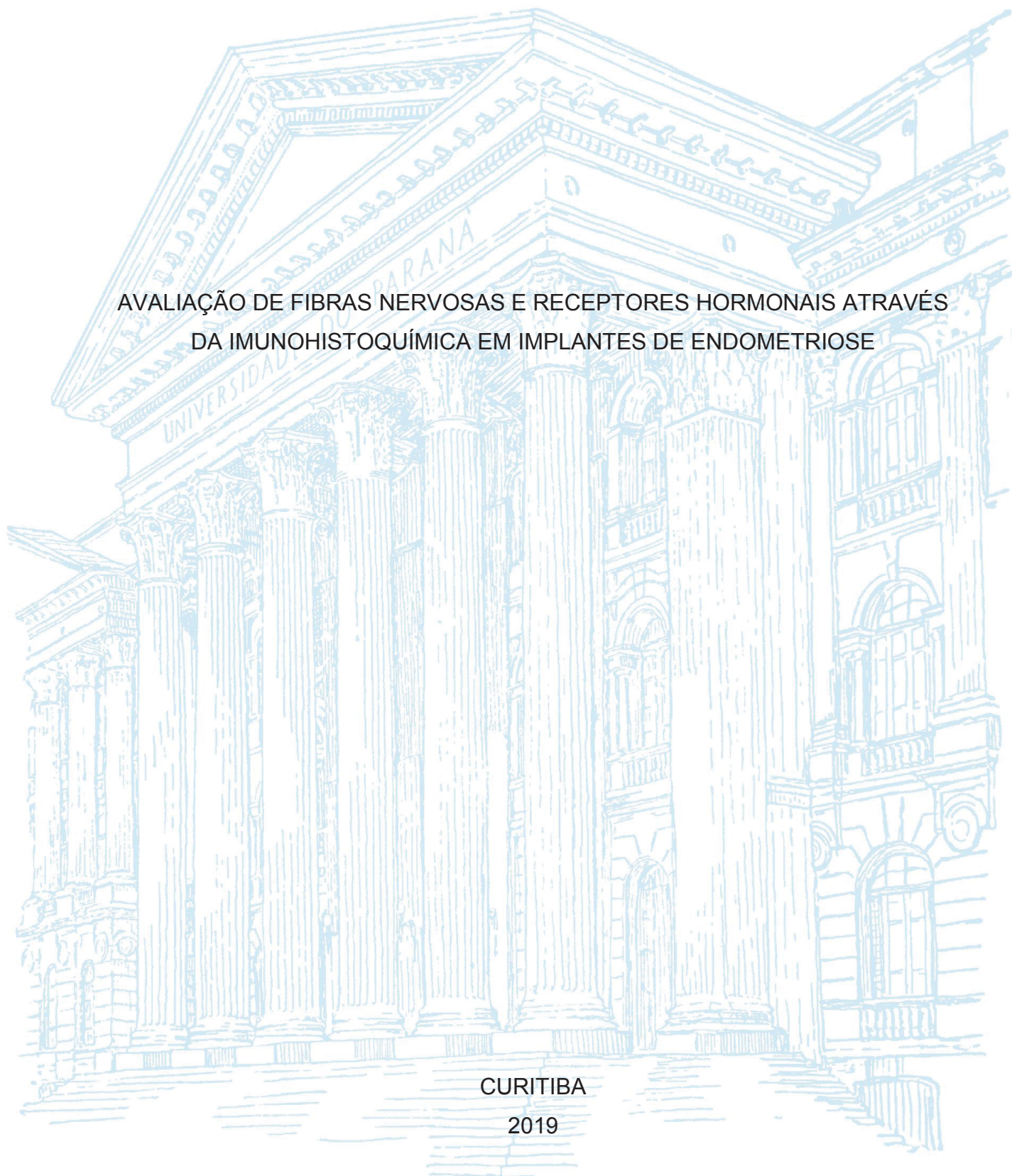
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUIZ RODRIGO GUIMARÃES FERREIRA

AValiação de Fibras Nervosas e Receptores Hormonais através  
da Imunohistoquímica em Implantes de Endometriose

CURITIBA

2019



LUIZ RODRIGO GUIMARÃES FERREIRA

AVALIAÇÃO DE FIBRAS NERVOSAS E RECEPTORES HORMONAIS ATRAVÉS  
DA IMUNOHISTOQUÍMICA EM IMPLANTES DE ENDOMETRIOSE

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tocoginecologia.

Orientador: Prof. Dr. Jaime Kulak Junior

CURITIBA

2019

F383 Ferreira, Luiz Rodrigo Guimarães  
Avaliação de fibras nervosas e receptores hormonais através da  
imunohistoquímica em implantes de endometriose [recurso eletrônico] /  
Luiz Rodrigo Guimarães Ferreira. – Curitiba, 2019.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em  
Tocoginecologia. Setor de Ciências da Saúde. Universidade  
Federal do Paraná.  
Orientador: Prof. Dr. Jaime Kulak Junior

1. Endometriose. 2. Fibras nervosas. 3. Imuno-histoquímica.  
I. Kulak Junior, Jaime. II. Programa de Pós-Graduação em Tocogi-  
ginecologia. Setor de Ciências da Saúde Universidade Federal do  
Paraná. III. Título.

NLMC: WP 440

# TERMO DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO TOCOGINECOLOGIA E  
SAÚDE DA MULHER - 40001016084P2

## TERMO DE APROVAÇÃO

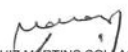
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em TOCOGINECOLOGIA E SAÚDE DA MULHER da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **LUIZ RODRIGO GUIMARAES FERREIRA**, intitulada: **AValiação DE FIBRAS NERVOSAS E RECEPTORES HORMONAIIS ATRAVÉS DE IMUNOHISTOQUÍMICA EM IMPLANTES DE ENDOMETRIOSE**, sob orientação do Prof. Dr. JAIME KULAK JUNIOR, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 13 de Dezembro de 2019.

  
JAIME KULAK JUNIOR  
Presidente da Banca Examinadora

  
RAFAEL FREDERICO BRUNS  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

  
LUIZ MARTINS COLLAÇO  
Avaliador Externo (FACULDADE EVANGÉLICA MACKENZIE DO  
PARANÁ)

Dedico esta dissertação a minha família, pelo apoio incondicional.  
Aos amigos, pela paciência e compreensão, quando, por várias vezes, não  
pude estar com vocês.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que, de alguma maneira, estiveram presentes e colaboraram nessa trajetória.

Ao Prof Dr. Jaime Kulak Junior por ter aceitado este desafio comigo, pelo empenho e pela orientação.

Ao Dr William Kondo, por todos os ensinamentos e por ter disponibilizado as pacientes e o banco de dados.

À Mônica Zomer Kondo por ter compartilhado desse desafio juntos e pelos momentos de companhia e compartilhamento de informações.

Agradeço à Prof<sup>a</sup> Dra Teresa Cavalcanti que abraçou meu trabalho com comprometimento e dedicação.

Ao Guilherme, do laboratório Neopath, pelo comprometimento e inestimável colaboração na confecção das lâminas, além da paciente a atenção dispensados para que esse trabalho pudesse ser realizado.

À banca examinadora da qualificação, Prof. Dr. Renato Nishiara, Prof. Dr. Luiz Martins Colaço e Prof. Dr. Rafael Frederico Bruns, pelas grandes contribuições para o aprimoramento deste estudo.

À banca que fará a arguição, Prof Dr. Jaime Kulak Junior, Prof. Dr. Renato Nishiara, Prof. Dr. Luiz Martins Colaço e Prof. Dr. Rafael Frederico Bruns, pela disponibilidade em avaliar meu trabalho e, com certeza, pelas futuras considerações.

A minha família e amigos agradeço pela compreensão, carinho e por acreditarem que eu poderia chegar até aqui.

Às pacientes, que nos confiam suas vidas, nos permitem estudar e aprender com suas moléstias.

Aos meus colegas de pós-graduação por compartilharem essa experiência comigo.

Ao Prof. Dr. Newton Sérgio de Carvalho e Prof Dr. Jaime Kulak Junior pelo comprometimento com este programa e ao servidor Vinícius Machado Mikosz sempre disposto a solucionar nossas demandas.

À UFPR, ao Hospital de Clínicas e ao colegiado, agradeço por enriquecerem a ciência e estarem dispostos a fazer o melhor pela pós-graduação.

## RESUMO

**Introdução:** A endometriose é definida pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina e apresenta-se como uma doença crônica, complexa e de sintomatologia variável, que pode gerar quadro de dor intensa e grande prejuízo na qualidade de vida. **Objetivo:** identificar a presença de fibras nervosas e receptores hormonais em implantes de endometriose e se o tratamento hormonal influencia as fibras nervosas e os receptores nessas lesões. **Material e Método:** estudo transversal, com coleta de dados histórico. A análise foi conduzida com base em 156 implantes de endometriose de 67 pacientes submetidas a cirurgia videolaparoscópica por endometriose. As pacientes foram divididas em 2 grupos: um grupo em vigência de tratamento hormonal (n=20) e outro grupo sem tratamento hormonal (n=47) previamente a cirurgia e as lesões divididas em superficiais e profundas. Foram incluídas mulheres na menacme, com quadro clínico de dor e/ou infertilidade e diagnóstico de endometriose que foram submetidas a cirurgia no período de junho 2016 a setembro de 2018. As peças foram analisadas após imunohistoquímica com ppg 9,5 para fibras nervosas e imunohistoquímica para receptores hormonais de estrogênio e progesterona. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística. **Resultados:** todas as topografias analisadas apresentaram fibras nervosas e receptores hormonais. Não houve diferença nas fibras nervosas e receptores hormonais de implantes profundos X superficiais. O tratamento hormonal reduziu o número de fibras nervosas nos ligamentos útero-sacros quando comparados as outras topografias ( $p = 0,001$ ). Além disso, a expressão dos receptores hormonais de progesterona superior à expressão dos receptores de estrogênio ( $p < 0,001$ ). **Conclusão:** as fibras nervosas e os receptores hormonais estão presentes nos implantes de endometriose das fossas ovarianas, ligamentos útero-sacros, fundo de saco e ovários. O tratamento hormonal reduz as fibras nervosas, sobretudo nos ligamentos útero-sacros. Os receptores de progesterona predominam nos implantes, independente do tratamento hormonal.

**Descritores:** Endometriose. Fibras nervosas. Receptores hormonais.

## ABSTRACT

**Introduction:** Endometriosis is defined by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity and is a chronic, complex disease with variable symptoms that can cause severe pain and great impairment in quality of life. **Purpose:** Identify the presence of nerve fibers and hormone receptors in endometriosis implants and whether hormone treatment influences nerve fibers and hormone receptors in these lesions. **Material and Method:** cross-sectional study. The analysis was conducted based on 156 endometriosis implants from 67 patients undergoing endometriosis videolaparoscopic surgery. The patients were divided into 2 groups: one group undergoing hormone treatment (n = 20) and another group without hormone treatment (n = 47) prior to surgery and lesions divided into superficial and deep. Women in the menopause with clinical pain and/or infertility and diagnosed with endometriosis who underwent surgery from June 2016 to September 2018 were included. The specimens were analyzed after ppg 9.5 immunohistochemistry for nerve fibers and for estrogen and progesterone hormone receptors. Values of  $p < 0.05$  indicated statistical significance. **Results:** All analyzed topographies presented nerve fibers and hormonal receptors. There was no difference in nerve fibers in deep or superficial implants. Hormonal treatment reduced the number of nerve fibers in the uterosacral ligaments when compared to other topographies ( $p = 0.001$ ). In addition, progesterone hormone receptor expression was higher than estrogen receptor expression ( $p < 0.001$ ). **Conclusion:** Nerve fibers and hormonal receptors are present in endometriosis implants in ovarian fossa, uterosacral ligaments, fund-sac and ovaries. Hormonal treatment reduces nerve fibers, especially in the uterosacral ligaments. Progesterone receptors predominate in implants, regardless of hormonal treatment.

**Key words:** Endometriosis. Nerve fibers. Hormone receptors.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ILUSTRAÇÃO DA INERVAÇÃO SIMPÁTICA E PARASSIMPÁTICA DA REGIÃO PÉLVICA .....	20
FIGURA 2 – FATORES EPIDEMIOLÓGICOS E MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA ENDOMETRIOSE E O SEU DESENVOLVIMENTO .....	22
FIGURA 3 – GLÂNDULA E ESTROMA ENDOMETRIAL (SETAS VERDES) EM MEIO A TECIDO FIBROSO COM COLORAÇÃO HE, EM AUMENTO DE 100X.....	31
FIGURA 4 – IMUNOPROCESSADOR LEICA.....	32
FIGURA 5 – CÁLCULO DO SCORE DE ALLRED .....	33
FIGURA 6 – FIBRAS NERVOSAS IDENTIFICADAS EM IMPLANTES DE ENDOMETRIOSE (SETAS VERMELHAS) APÓS IMUNOHISTOQUÍMICA COM PGP 9,5, EM AUMENTO DE 100X..	34
FIGURA 7 – IMPLANTE DE ENDOMETRIOSE APÓS IMUNOHISTOQUÍMICA PARA RP (RECEPTOR PROGESTERONA) – NÚCLEOS AMARRONADOS, EM AUMENTO DE 100X .....	35
FIGURA 8 – IMPLANTE DE ENDOMETRIOSE APÓS IMUNOHISTOQUÍMICA PARA RE (RECEPTOR ESTROGÊNIO) – NÚCLEOS AMARRONADOS, EM AUMENTO DE 100X .....	36
FIGURA 9 – FLUXOGRAMA COM NÚMERO TOTAL DE PACIENTES DIVISÃO DE ACORDO COM USO DE TRATAMENTO HORMONAL .....	39
FIGURA 10 – NO GRÁFICO ACIMA, COMPARAMOS AS FIBRAS NERVOSAS NOS LIGAMENTOS ÚTERO-SACROS E FOSSAS OVARIANAS NOS GRUPOS COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL, E OBSERVA-SE UMA MENOR QUANTIDADE DE FIVRAS NERVOSAS NO GRUPO TRATADO COM HORMÔNIO NOS LIGAMENTOS ÚTERO-SACROS.....	43
FIGURA 11 – IMPLANTE DE ENDOMETRIOSE COM PRESENÇA DE FILETES NERVOSOS IDENTIFICADOS COM PGP 9,5 (SETAS), AUMENTO DE 100X.....	44
FIGURA 12 – IMPLANTE DE ENDOMETRIOSE SEM PRESENÇA DE FILETES NERVOSOS, AUMENTO 100X.....	45

FIGURA 13 – RECEPTORES HORMONAIIS DE ESTROGÊNIO IDENTIFICADOS EM FOCO DE ENDOMETRIOSE POR IMUNOHISTOQUÍMICA (NÚCLEOS AMARRONADOS) EM AUMENTO DE 400X.....	49
FIGURA 14 – RECEPTORES HORMONAIIS DE PROGESTERONA IDENTIFICADOS EM FOCO DE ENDOMETRIOSE POR IMUNOHISTOQUÍMICA (NÚCLEOS AMARRONADOS) EM AUMENTO DE 400X.....	50
FIGURA 15 – SCORE DE ALLRED DOS RECEPTORES HORMONAIIS DE ESTROGÊNIO E PROGESTERONA EM IMPLANTES DE ENDOMETRIOSE NAS DIFERENTES TOPOGRAFIAS .....	51

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPARAÇÃO DAS FIBRAS NERVOSAS DE ACORDO COM A TOPOGRAFIA E PROFUNDIDADE DA LESÃO.....	40
TABELA 2 – NÚMERO TOTAL DE IMPLANTES DE ENDOMETRIOSE EM CADA TOPOGRAFIA ANALISADA.....	40
TABELA 3 – COMPARAÇÃO DAS FIBRAS NERVOSAS (NÚMERO DE FIBRAS) E RECEPTORES HORMONAIS (ESCORE DE ALLRED) NOS GRUPOS COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL NA FOSSA OVARIANA (FO).....	40
TABELA 4 – COMPARAÇÃO DAS FIBRAS NERVOSAS (NÚMERO DE FIBRAS) E RECEPTORES HORMONAIS (ESCORE DE ALLRED) NOS GRUPOS COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL NO FUNDO DE SACO ANTERIOR (FSA) .....	41
TABELA 5 – COMPARAÇÃO DAS FIBRAS NERVOSAS (NÚMERO DE FIBRAS) E RECEPTORES HORMONAIS (ESCORE DE ALLRED) NOS GRUPOS COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL NOS LIGAMENTOS ÚTERO-SACROS (LUS) .....	41
TABELA 6 – COMPARAÇÃO DAS FIBRAS NERVOSAS (NÚMERO DE FIBRAS) E RECEPTORES HORMONAIS (ESCORE DE ALLRED) NOS GRUPOS COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL NOS OVÁRIOS .....	41
TABELA 7 – COMPARAÇÃO DE IMPLANTE DE ENDOMETRIOSE COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL NA FOSSA OVARIANA X LIGAMENTO ÚTERO-SACRO EM UMA MESMA PACIENTE .....	43
TABELA 8 – COMPARAÇÃO DE IMPLANTE DE ENDOMETRIOSE COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL NA FOSSA OVARIANA E FUNDO DE SACO ANTERIOR EM UMA MESMA PACIENTE.....	46
TABELA 9 – COMPARAÇÃO DE IMPLANTE DE ENDOMETRIOSE COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL NA FOSSA OVARIANA X OVÁRIO EM UMA MESMA PACIENTE.....	46
TABELA 10 – COMPARAÇÃO DE IMPLANTE DE ENDOMETRIOSE COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL NO FUNDO DE SACO ANTERIOR X LIGAMENTO ÚTERO-SACRO.....	47

TABELA 11 – COMPARAÇÃO DE IMPLANTE DE ENDOMETRIOSE COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL NO LIGAMENTO ÚTERO-SACRO X OVÁRIO.....	47
TABELA 12 – COMPARAÇÃO DOS RECEPTORES HORMONAIS DE ESTROGÊNIO E PROGESTETONA NAS LESÕES ENDOMETRIÓTICAS .....	48

## LISTA DE SIGLAS

ACO: Antoconcepcionais Orais Combinados

FO: Fossa ovariana

FSA: Fundo de Saco Anterior

FSP: Fundo de Saco Posterior

HC: Hospital de Clínicas

LUS: Ligamento Útero-sacro

RE: Receptor de estrogênio

RE $\alpha$ : Receptor de estrogênio alfa

RE $\beta$ : Receptor de estrigênio beta

RP: Receptor de progesterona

RPa: Receptor de progesterona A

RPb: Receptor de progesterona B

UFPR: Universidade Federal do Paraná

## LISTA DE SÍMBOLOS

$>$	Maior
$<$	Menor
$\geq$	Maior ou igual
$\leq$	Menor ou igual
$\%$	Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1	OBJETIVOS.....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
2.1	ENDOMETRIOSE.....	19
2.2	ANATOMIA DA INERVAÇÃO PÉLVICA.....	19
2.3	FISIOPATOLOGIA DA ENDOMETRIOSE.....	20
2.4	MECANISMOS DE DOR NA ENDOMETRIOSE.....	22
2.5	IDENTIFICAÇÃO DE FIBRAS NERVOSAS NO ENDOMÉTRIO.....	24
2.6	FIBRAS NERVOSAS E LESÕES ENDOMETRIÓTICAS.....	24
2.7	ENDOMETRIOSE, ESTROGÊNIO E PROGESTERONA E RECEPTORES HORMONAIS.....	27
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	30
3.2	PACIENTES E PROCEDÊNCIA DO MATERIAL.....	30
3.3	PROCESSAMENTO DO MATERIAL E IMUNOHISTOQUÍMICA.....	31
3.4	EXPRESSÃO DOS RECEPTORES HORMONAIS RE E RP.....	33
3.5	AVALIAÇÃO DAS FIBRAS NERVOSAS.....	36
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
4.1	COMPARAÇÃO DOS GRUPOS DEFINIDOS PELO HORMÔNIO (NÃO E SIM) EM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS AVALIADAS.....	40
4.2	COMPARAÇÃO ENTRE AS TOPOGRAFIAS DE LESÃO, DENTRO DE CADA GRUPO.....	42
4.3	COMPARAÇÃO ENTRE AS TOPOGRAFIAS DE UMA MESMA PACIENTE COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL.....	42
4.4	COMPARAÇÃO DOS RECEPTORES HORMONAIS DE ESTROGÊNIO E PROGESTERONA NAS DIFERENTES TOPOGRAFIAS.....	48
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>58</b>
	<b>ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b> .....	<b>64</b>
	<b>ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> .....	<b>68</b>

<b>ANEXO 3 – TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA.....</b>	<b>69</b>
--	-----------



## 1 INTRODUÇÃO

A endometriose é definida pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina e representa uma condição clínica das mais desafiadoras para o ginecologista. Apresenta-se como uma doença crônica, complexa e sintomatologia variável - desde assintomáticas a quadro de dor intensa e grande prejuízo na qualidade de vida. As manifestações clínicas mais comuns são: dismenorréia, dispareunia, dor pélvica crônica e infertilidade. É uma das condições ginecológicas benignas mais comuns, acomete entre 10 a 15% das mulheres em idade reprodutiva - essa prevalência pode aumentar até 30% em pacientes com infertilidade e até 45% em pacientes com dor pélvica crônica, e é uma patologia extremamente debilitante, com efeitos prejudiciais no funcionamento social, ocupacional e psicológico das pacientes (BURNEY *et al.*, 2012; MEHEDINTU *et al.*, 2014).

Um estudo prospectivo e multicêntrico conduzido em 10 países europeus, demonstrou que o custo total anual médio, por paciente com endometriose, em 2008, foi de quase 10.000 euros, incluindo cuidados de saúde e perda de custos na produtividade. Estima-se que as mulheres afetadas tenham prejuízo de aproximadamente 10 horas/semanais de trabalho, principalmente devido à redução da eficácia durante a produção. Nos EUA, os custos médicos totais das pacientes com endometriose são 63% mais altos (US \$ 706 por mês) do que as mulheres sem a patologia (US \$ 433). No Canadá, o custo médio anual estimado da endometriose em 2009 foi de US \$ 5.200 por paciente, um custo anual total alto para a sociedade canadense. Embora o custo exato das consequências da patologia não possa ser mensurado rigorosamente, a endometriose constitui claramente um ônus substancial não apenas para a saúde e qualidade de vida individual das mulheres, mas também dos recursos de saúde dos sistemas nacionais de saúde (SIMOENS *et al.*, 2012; NNOAHAM *et al.*, 2011; MIRKIN *et al.*, 2007).

Endometriose é classificada com base na gravidade, localização, profundidade e tamanho dos implantes: estágio I (doença mínima), estágio II (doença leve), estágio III (doença moderada) e estágio IV (doença grave). Além desta classificação, também pode ser dividida em endometriose superficial e endometriose profunda – a qual implica em infiltração da endometriose abaixo de 5 mm sob o peritônio. Esta classificação, no entanto, não tem sucesso em prever a

repercussão clínica em mulheres portadoras da doença (SUTTON *et al.*, 2005; FAUCONNIER *et al.*, 2005).

Embora nos últimos anos a endometriose tenha sido alvo de inúmeros estudos, a fisiopatologia da doença ainda não está completamente elucidada, e a associação entre a extensão observada da doença e a intensidade da dor é particularmente pobre (FAUCONNIER *et al.*, 2005; BERKLEY *et al.*, 2005). É reconhecido que a endometriose é uma patologia estrogênio-dependente e alguns estudos apontam que uma desregulação na expressão dos receptores de estrogênio nas lesões endometrióticas poderiam ter influência na etiologia da doença (GUO *et al.*, 2014).

Vale destacar que diversos estudos demonstraram uma possível relação das fibras nervosas com focos de endometriose e a severidade da dor. Foi observado um número de fibras nervosas significativamente maior no peritônio de pacientes com lesões de endometriose quando comparadas a pacientes sem a doença. Adicionalmente, pacientes nas quais foram observadas maior quantidade de fibras nervosas associadas a lesões de endometriose, eram mais propensas a quadro de dor severa. A fisiopatologia da dor associada a endometriose pode ser dependente do tipo e da localização da lesão endometriótica, e se torna fundamental identificar e estabelecer essas possíveis associações (MECHSNER *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009; TOKUSHIGUE *et al.*, 2006).

Diversos estudos demonstraram a eficácia do tratamento medicamentoso para dor associada a endometriose. Contraceptivos orais combinados, noretindrona e dienogeste reduziram significativamente sintomas que incluem dispareunia profunda, dismenorréia e dor pélvica em pacientes com endometriose (VERCELLINI *et al.*, 2013; PARAZZINI *et al.*, 2000).

A gênese da endometriose parece estar diretamente relacionada à ação estrogênica e alguns estudos demonstraram que implantes de endometriose, quer sejam de localizações ovarianas ou peritoneais, exibem expressão de RE $\beta$  superior quando comparadas com células endometriais normais (BULUN *et al.*, 2012). Por outro lado, a mudança na expressão de alvos de progestágeno em células estromais endometriais em um ambiente inflamatório poderia contribuir para a resistência à progesterona observada em células endometrióticas e, em última análise, influenciar o planejamento de terapias hormonais destinadas a tratar esta doença (GRANDI *et*

*al.*, 2016). Tais fatos indicam uma possível relevância dos receptores hormonais de progesterona na gênese e manutenção da patologia.

Nesse contexto, esse estudo propõe detectar e quantificar fibras nervosas em implantes de endometriose de diferentes topografias e a expressão dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona nesses locais, além de uma possível interferência do tratamento hormonal nessas lesões.

## 1.1 OBJETIVOS

Objetivo principal:

- Identificar a presença de fibras nervosas em diferentes topografias de implantes de endometriose;

Objetivos secundários:

- Identificar a presença e expressão de receptores de estrogênio e progesterona nas lesões de endometriose;
- Verificar se o tratamento hormonal pode reduzir as fibras nervosas nos implantes de endometriose;
- Verificar se há influência do tratamento hormonal na expressão dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ENDOMETRIOSE

A endometriose é classicamente definida como a presença de glândulas endometriais e estroma em locais ectópicos, principalmente o peritônio pélvico, ovários e septo retovaginal. Afeta aproximadamente 10 a 15% das mulheres em idade reprodutiva, e os principais sintomas da patologia incluem dismenorréia, dispareunia, dor pélvica crônica e / ou infertilidade (BURNEY *et al.*, 2012). A doença pode ser dividida em superficial ou profunda – quando a espessura dos focos é superior a 5mm de profundidade.

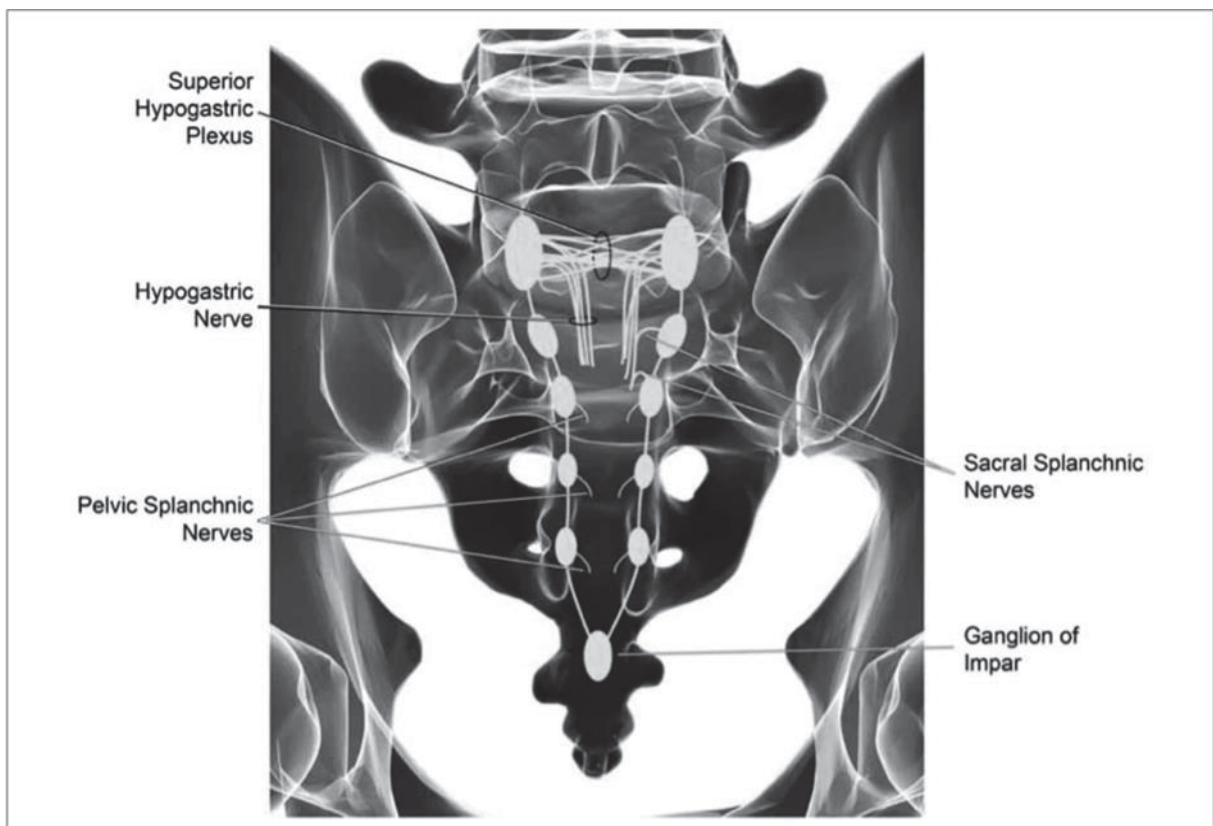
Um rico suprimento vascular é necessário para o desenvolvimento e sustentação de lesões endometrióticas, particularmente no microambiente peritoneal, que é relativamente avascular comparado ao endométrio tópico. A neoangiogênese e o recrutamento capilar são visíveis nas lesões endometrióticas na laparoscopia. Além disso, os nervos freqüentemente acompanham a angiogênese (neuroangiogênese), provavelmente contribuindo para a dor associada a esse distúrbio (ASANTE *et al.*, 2011). O perfil da expressão gênica do endométrio da fase menstrual em mulheres com endometriose demonstrou aumento da expressão do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-8 (IL-8) e MMP-3. Como a IL-8 e o TNF- $\alpha$  promovem a proliferação e adesão de células endometriais e angiogênese, uma superabundância dessas citocinas pode facilitar o crescimento e a neovascularização local. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) tem sido consistentemente detectado em alta concentração no líquido peritoneal de mulheres com endometriose, e o nível parece estar correlacionado com o estágio da doença (KYAMA *et al.*, 2006).

### 2.2 ANATOMIA DA INERVAÇÃO PÉLVICA

A dor visceral e as fibras nervosas simpáticas da região pélvica freqüentemente caminham com fibras somáticas. Cada nervo espinhal recebe estímulo simpático de fibras pós-ganglionares não mielinizadas através de ramos comunicantes cinzentos do gânglio adjacente. Os ramos comunicantes brancos, presentes de T1 a L1 ou L2, permitem que essa entrada continue na medula espinhal,

agora como fibras pré-ganglionares mielinizadas. Isto sugere que a informação transportada dentro de fibras simpáticas originadas na região pélvica abaixo de L2 entraria na cadeia paravertebral em seu respectivo nível através dos ramos cinzentos, viajando dentro da cadeia cefálica até pelo menos L2 (ou potencialmente até mais alto) buscando o primeiro ramo branco a entrar na medula espinhal e se reportar ao sistema nervoso central (HUNTER *et al.*, 2018) (FIGURA 1).

FIGURA 1 – ILUSTRAÇÃO DA INERVAÇÃO SIMPÁTICA E PARASSIMPÁTICA DA REGIÃO PÉLVICA



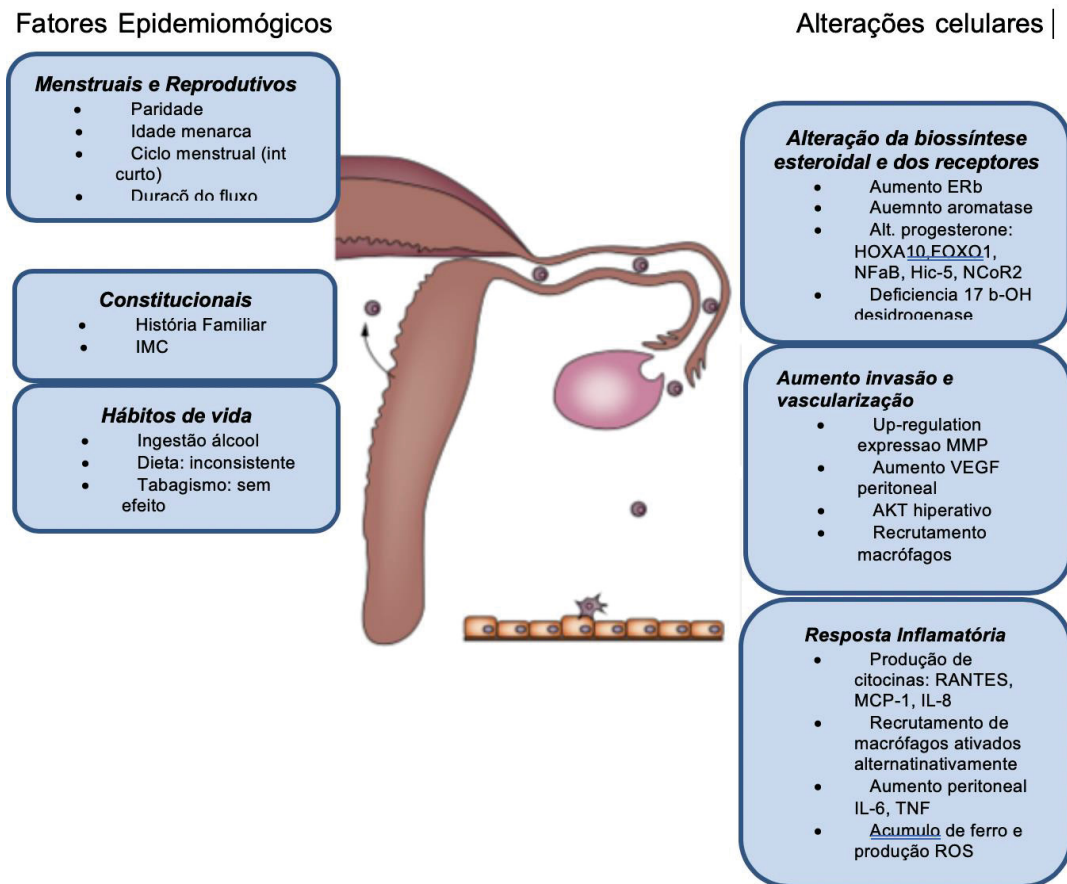
FONTE: Adaptado de HUNTER *et al.* (2018).

### 2.3 FISIOPATOLOGIA DA ENDOMETRIOSE

Embora a fisiopatologia ainda não esteja completamente elucidada e provavelmente, diversos fatores devem estar relacionados no estabelecimento da endometriose, a hipótese melhor sustentada por evidências científicas robustas baseia-se no chamado fenômeno de menstruação retrógrada. Nela, células endometriais viáveis são conduzidas através das tubas uterinas para a cavidade pélvica. Quando atingem a cavidade peritoneal, podem implantar, crescer e invadir

estruturas pélvicas. A probabilidade deste evento é influenciada epidemiologicamente por fatores menstruais, reprodutivos ou pessoais - como a idade precoce da menarca, longa duração dos fluxos menstruais, e biologicamente por qualquer alteração na menstruação. O nível molecular que favorece o processo gradual de implantação e crescimento celular em locais ectópicos esta representado na Figura 2. Um padrão familiar da endometriose está firmemente estabelecido em humanos e não humanos. A doença tem etiologia genética complexa que requer a interação de inúmeras variantes genéticas e fatores ambientais. Fatores genéticos contribuem com cerca de metade da variação no risco de endometriose, com uma estimativa de hereditariedade de 51%. Meta-análises dos poucos estudos de associação genómica realizados forneceram evidências de uma associação robusta de endometriose com sete loci de risco (VERCELLINI *et al.*, 2013).

FIGURA 2 – FATORES EPIDEMIOLÓGICOS E MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA ENDOMETRIOSE E O SEU DESENVOLVIMENTO



Células endometriais viáveis são conduzidas através das tubas uterinas por menstruação retrógrada, devido a um gradiente de pressão originado possivelmente de contrações uterinas dissinérgicas. Quando atingem a cavidade peritoneal, podem implantar, crescer e invadir as estruturas pélvicas. A probabilidade desse evento é influenciada epidemiologicamente por qualquer fator menstrual, reprodutivo ou pessoal que aumenta a contaminação pélvica pelo endométrio regurgitado, como a idade precoce da menarca ou uma longa duração de cada fluxo menstrual. Biologicamente, a probabilidade desse evento é influenciada por qualquer alteração em nível molecular que favorece o processo gradual de implantação e crescimento celular em locais ectópicos.

FONTE: Adaptado de VERCELLINI *et al.* (2013).

## 2.4 MECANISMOS DE DOR NA ENDOMETRIOSE

Múltiplos mecanismos estão implicados na fisiopatologia da dor associada à endometriose, incluindo nocicepção, inflamação e alterações no processamento da dor no sistema nervoso periférico e central (KOBAYASHI *et al.*, 2014). Assim como também ocorre em outras condições crônicas, a dor na endometriose é freqüentemente associada a sofrimento psicológico e fadiga, ambos os quais podem amplificar a dor (MOROTTI *et al.*, 2017).

O ambiente pró-inflamatório pode modular as funções do sistema de sinalização induzido por neurotrofinas, o que leva à dor pélvica associada à endometriose (KYAMA *et al.*, 2009).

Alterações no líquido peritoneal em mulheres com endometriose receptor canal 1 vanilloide (TRPV1) (ROCHA *et al.*, 2011).

Além disso, as citocinas (tais como: IL-1b, IL-6 e TNFa), fatores de crescimento (tais como fator de crescimento neural b e fator de crescimento endotelial vascular) e várias quimiocinas, tais como CCL2 (também conhecida como proteína quimiotática monócito - 1), que são secretadas por células do sistema imunológico, também estão presentes em níveis aumentados no fluído peritoneal de pacientes com endometriose. Eles podem sensibilizar diretamente os nervos periféricos através de receptores específicos da superfície celular ou ativar feedbacks complexos, que amplificam a resposta inflamatória microambiental e a geração de dor (ARNOLD *et al.*, 2013).

É interessante notar que, como observado em outras doenças crônicas, na endometriose ocorre uma “desregulação” periférica do sistema nervoso autônomo (perda de fibras nervosas simpáticas próximas às lesões e aumento da presença em regiões distantes) (FERRERO *et al.*, 2010; TOKUSHIGUE *et al.*, 2010; MILLER *et al.*, 2015). Além disso, o aumento significativo da densidade das fibras nervosas sensoriais nas lesões de endometriose parece também desempenhar um papel crucial como fator na gênese da dor (MILLER *et al.*, 2015).

Alguns autores postularam que o desequilíbrio qualitativo das fibras nervosas observado em tecidos inflamados cronicamente, ou seja, um aumento local de fibras nervosas sensoriais e uma perda concomitante de fibras nervosas simpáticas, pode ser importante na manutenção de um ambiente pró-inflamatório local ao redor das lesões. Curiosamente, os estrogênios, que desempenham um papel fundamental na patogênese da endometriose, podem também, direta ou indiretamente, influenciar as fibras nervosas periféricas. Os estrogênios podem regular o NGF, o VEGF e o BDNF, suportando uma ligação direta entre os estrogênios e a neuroangiogênese, mas também podem modular a expressão de algumas subclasses de semaforinas, que são importantes para a regulação das fibras nervosas simpáticas (WANG *et al.*, 2009; SCHEERER *et al.*, 2017; BARCENA DE ARELLANO *et al.*, 2011).



## 2.5 IDENTIFICAÇÃO DE FIBRAS NERVOSAS NO ENDOMÉTRIO

Inicialmente, com o intuito de identificar possíveis fatores relacionados a alterações que poderiam indicar propensão a endometriose, alguns estudos buscaram identificar fibras nervosas no endométrio tópico através de biópsias de endométrio. O endométrio tópico parece ser a única região do corpo humano onde a mucosa normalmente não é inervada. Com a disponibilidade de marcadores imunohistoquímicos pan-neuronais, em especial o PGP 9.5 – o qual identifica fibras nervosas mielinizadas e não-mielinizadas, é possível identificar, quantificar e avaliar a distribuição das fibras nervosas nos órgãos reprodutores de mulheres com e sem endometriose (WANG *et al.*, 2009; AGHAEY MEIBODY *et al.*, 2010).

Tokushige *et al.* (2007) identificaram pequenas fibras nervosas do tipo C tanto no miométrio quanto no endométrio e um aumento na densidade dessas fibras nervosas no miométrio de pacientes com endometriose (TOKUSHIGUE *et al.*, 2007).

Zhang *et al.* (2009) identificaram fibras nervosas na camada funcional do endométrio de pacientes com dor pélvica, endometriose, adenomiose e miomatose uterina.

Medina *et al.* (2010) tentaram demonstrar que a densidade de fibras nervosas em amostras de biópsia de endométrio por coloração com PGP 9.5 e sua identificação por imunohistoquímica poderia ser utilizado como um método menos invasivo para o diagnóstico de endometriose (MEDINA *et al.*, 2009).

No entanto, estudos posteriores demonstraram que a detecção de fibras nervosas no endométrio não é nem um marcador sensível nem específico de endometriose. Elas podem estar presentes em outras condições ginecológicas como adenomiose, miomatose uterina e pacientes com dor pélvica (ELLET *et al.*, 2015).

## 2.6 FIBRAS NERVOSAS E LESÕES ENDOMETRIÓTICAS

O estudo da distribuição regional e tipos de fibras nervosas no endométrio, miométrio e lesões endometrióticas tornou-se possível com a disponibilidade de marcadores imunohistoquímicos pan-neuronais potentes, em especial o anticorpo de produto do gene 9.5, que sinaliza tanto as fibras nervosas mielinizadas quanto as fibras não-mielinizadas. Usando este marcador imunohistoquímico pan-neuronal, foi

possível identificar a presença, expressão e distribuição de fibras nervosas nos tecidos reprodutivos de mulheres com e sem endometriose por diversos autores (MECHSNER *et al.*, 2009; FERRERO *et al.*, 2010; AGHAEY MEIBODY *et al.*, 2010; TOKUSHIGUE *et al.*, 2007).

Anaf *et al.* (2000) foram os primeiros a identificar uma relação entre as lesões endometrióticas e as fibras nervosas, observando-se uma invasão neural em lesões de endometriose profunda no septo retovaginal em pacientes com dor pélvica (ANAF *et al.*, 2000). Isso levou os autores à hipótese de que a compressão física das fibras nervosas pelas lesões infiltrantes poderia estar envolvida na dor significativa associada a este tipo de lesão (KELM *et al.*, 2008).

Chen *et al.* (2015) em estudo experimental em ratos com endometriose, demonstrou que várias citocinas pró-inflamatórias estavam elevadas no enxerto uterino, assim como maior diâmetro das fibras nervosas do nervo, em comparação com amostras de nervo normal (CHEN *et al.*, 2015).

Utilizando um modelo de endometriose em camundongos, Greaves *et al.* (2015), demonstraram que a infiltração de macrófagos nas lesões de endometriose era dependente de E2 e que as concentrações de mRNAs codificando Csf-1, Nt-3 e TrkB eram reguladas por E2 em lesões endometrióticas (GREAVES *et al.*, 2015).

As lesões endometrióticas – para serem sustentadas, devem ser vascularizadas, e os vasos sanguíneos que auxiliam na angiogênese são presumidamente inervados por fibras sensoriais e do Sistema nervosa simpático (STRATTON *et al.*, 2011).

Essa inervação possibilita que fatores neutrófilos e angiogênicos ajam nos vasos sanguíneos e nas fibras nervosas e, no momento que o vaso sanguíneo se ramifica para suprir a lesão, a inervação desse vaso também pode ramificar, levando a infiltração nervosa dessas lesões (FRASER *et al.*, 2010).

Se as lesões de endometriose atraem sua própria fonte nervosa ao invadir o peritônio ou tecidos profundos, a ramificação e proliferação destes nervos provavelmente se desenvolvem a partir do plexo nervoso subperitoneal mais próximo (TOKUSHIGUE *et al.*, 2007). Esta atração é provavelmente nutrida por neurotrofinas, em particular o NGF e seus receptores, que estão envolvidos no crescimento e manutenção dos nervos sensoriais, e esta inervação pode desempenhar um papel chave na gênese da dor (KOGAN *et al.*, 2014).

As lesões endometrióticas possuem fibras nervosas sensoriais, do sistema nervoso simpático e parassimpático. Tokushigue *et al.* (2006) em estudo com 40 pacientes com endometriose, demonstraram que a densidade de fibras nervosas nas lesões endometrióticas peritoneais foi muito maior do que no peritônio normal em mulheres sem endometriose e sugerem que a inervação de lesões endometrióticas segue princípios similares com estimulação do crescimento extensivo de neurônios dos nervos peritoneais locais pelo aumento da expressão local de NGF e seus receptores (TOKUSHIGUE *et al.*, 2006; GUO *et al.*, 2014).

Em um estudo piloto que investigou a relevância clínica de fibras nervosas em lesões peritoneais, os sintomas de dor da endometriose foram correlacionados com maior densidade de fibras nervosas peritoneais. Em mulheres com endometriose peritoneal, nas pacientes que relataram dor pélvica moderada ou grave e/ou dismenorréia foram detectadas mais fibras nervosas associadas a endometriose (82,6% dos pacientes que relataram dor  $\geq 3$  em uma escala de 10 pontos). Por outro lado, no grupo de pacientes classificados como tendo endometriose peritoneal, mas que registaram sintomas de dor significativamente reduzidos ( $\leq 2$ ), apenas duas mulheres (33%) mostraram a presença de fibras detectáveis associadas à endometriose, que foram consideravelmente menos densas (KOBAYASHI *et al.*, 2014).

Zhang *et al.* (2009) em estudo com pacientes com dor e diagnóstico de endometriose observaram um aumento na expressão de fibras nervosas identificadas com PGP 9,5 no foco de endometriose e tecido adjacente quando comparadas a pacientes sem dor (ZHANG *et al.*, 2009).

Em um estudo experimental, Chen *et al.* (2015) demonstraram que houve um número significativamente menor de fibras nervosas no grupo que foi tratado com células tronco quando comparados ao grupo controle (CHEN *et al.*, 2015).

Novella-Maestre *et al.* (2012) revelaram que os agentes antiangiogênicos como agonistas da dopamina são capazes de diminuir a densidade de fibras nervosas presentes em lesões de endometriose em estudo experimental. Simultaneamente, a formação de vasos sanguíneos imaturos também diminuiu empregando Cb2 (NOVELLA-MAESTRE *et al.*, 2012).

## 2.7 ENDOMETRIOSE, ESTROGÊNIO E PROGESTERONA E RECEPTORES HORMONAIIS

A influência dos hormônios femininos na fisiologia nervosa já foi estudada. A progesterona parece ter ação importante na promoção da mielinização das estruturas nervosas. Portanto, ao menos teoricamente, isso protegeria contra eventos neurodegenerativos gerados por qualquer trauma físico (KOGAN *et al.*, 2014). Em modelos animais, o estrogênio demonstrou um efeito importante na melhora da inervação simpática das fibras nervosas, permitindo a regeneração nervosa e a reinervação final dos tecidos danificados (SMITH *et al.*, 2009).

Os receptores de estrogênio alfa e beta ligam-se ao Estradiol (E2). Os receptores beta tem ação tanto antiproliferativa – como no endométrio, mas também ação pró-inflamatória e antiapoptótica, e parecem ter um papel importante na gênese da endometriose (HAN *et al.*, 2015).

As lesões endometrióticas, quer sejam de localizações ovarianas ou peritoneais, exibem expressão de RE $\beta$  superior quando comparadas com células endometriais normais (BULUN *et al.*, 2012). A inflamação aumentada e a apoptose reduzida sustentariam o crescimento de lesões endometrióticas. Alterações na expressão do receptor de estrogênio (ER)  $\alpha$  e  $\beta$  acompanham a conversão de células endometriais residentes dentro do ambiente uterino normal para lesões ectópicas localizadas em locais extra-uterinos. Diversos estudos apontam os RE $\beta$  à desregulação das redes apoptóticas e inflamatórias, identificando-os como co-participadores na gênese da endometriose (SIMMEN *et al.*, 2016).

As progestinas têm o potencial de se ligar a receptores nucleares, influenciando sua atividade local nas células endometrióticas. Esta atividade local dependerá da expressão do receptor de progesterona que ocorre nas células endometriais em um ambiente inflamatório crônico. A ação da progesterona se faz através dos seus receptores A (RP-A) e B (RP-B), os quais são codificados por um único gene. A cadeia do RP contém domínios funcionais bem definidos, sendo um domínio N-terminal de transcrição, um domínio central de ligação ao DNA e um domínio de ligação C-terminal. As duas isoformas RP-A e RP-B formam homo e heterodímeros (AA, BB, AB) no processo de ativação da transcrição, que se ligam a elementos de resposta da progesterona na região promotora do gene da progesterona. Esses receptores apresentam grande similaridade na cadeia principal,

porém apresentam conformação espacial diferente e se distribuem diferentemente pelos tecidos. Essas duas isoformas têm, também, ações distintas dependentes do tecido alvo, sendo que, na maioria das vezes, o RP-B funciona como um ativador (agonista), ao passo que o RP-A funciona como um frenador (antagonista) da transcrição do gene da progesterona. Em determinados tecidos e, a depender do ciclo menstrual, o RP-A pode não exercer nenhuma ação direta, mas pode funcionar como repressor do RP-B, bem como dos receptores androgênicos e estrogênicos e também dos receptores de mineralocorticoide e glicocorticoide. Esse efeito pode ser observado no estroma e no epitélio das glândulas endometriais. Esses dois sítios apresentam ambas as isoformas. Grandi *et al.* (2016) em um estudo utilizando células primárias do estroma endometrial isoladas de mulheres com endometriose, identificaram a expressão protéica dos receptores de progesterona A e B, receptores de progesterona de membrana 1 e 2, receptores androgênicos, receptores de mineralocorticóides e receptores de glicocorticóides após exposição às citocinas inflamatórias Fator de Necrose Tumoral (TNF $\alpha$ ) e interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Os resultados indicaram que ambas as citocinas reduziram a expressão de receptores de progesterona e aumentaram a expressão dos receptores de glicocorticóides nas células do estroma endometrial. A mudança na expressão de alvos de progestágeno em células estromais endometriais em um ambiente inflamatório poderia contribuir para a resistência à progesterona observada em células endometrióticas e, em última análise, influenciar o planejamento de terapias hormonais destinadas a tratar esta doença (GRANDI *et al.*, 2016).

O uso de anticoncepcionais orais combinados ou com progesterona isolada é atualmente um dos principais tratamentos utilizados em mulheres com endometriose para manejo da dor. Além dos conhecidos efeitos provocados pela amenorreia, Tarjanne *et al.* (2015) demonstraram que tais medicamentos teriam a capacidade de influenciar diretamente as fibras nervosas encontradas nas lesões endometrióticas. Em estudo com 45 mulheres submetidas a tratamento cirúrgico por endometriose profunda, o uso de terapia hormonal foi associado a densidades reduzidas de fibras nervosas simpáticas, parassimpáticas e sensoriais em lesões de endometriose profunda. A densidade de fibras nervosas totais foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) em lesões coletadas de mulheres tratadas com hormônios em comparação com lesões em mulheres não tratadas (TARJANNE *et al.*, 2015).

Tokushigue *et al.* (2009) também descreveram resultados semelhantes. Em estudo com 22 pacientes submetidas a tratamento cirúrgico de endometriose peritoneal, evidenciou-se que as pacientes tratadas com progesterona isolada ou com contraceptivos orais combinados apresentaram diminuição significativa da densidade das fibras nervosas quando comparada a pacientes não tratadas (TOKUSHIGUE *et al.*, 2009).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê Ética e Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (HC / UFPR), sob o número 2313645 (ANEXO 1). Embora trata-se de um estudo transversal e com análise de amostras armazenadas, antes do ato cirúrgico as pacientes concordaram na liberação dos dados para trabalhos científicos conforme modelo em anexo (ANEXO 2).

#### 3.2 PACIENTES E PROCEDÊNCIA DO MATERIAL

Trata-se de um estudo transversal com coletas de dados histórica.

Foram utilizadas amostras de peças anátomo-patológicas de pacientes submetidas a cirurgia laparoscópica por endometriose no período de junho de 2016 a setembro de 2018.

As cirurgias foram realizadas por infertilidade e/ou dor pélvica e foram realizadas pelo mesmo cirurgião com grande experiência em endometriose – Dr W. K. Posteriormente a cirurgia, as peças foram encaminhadas ao mesmo laboratório e analisadas pelo patologista, também com grande expertise no assunto – Neopath, Dra T. C.

Após a seleção das pacientes, foi realizada análise minuciosa dos prontuários e dos anátomos patológicos e registrado as seguintes informações: indicação da cirurgia: Dor X Infertilidade; uso de tratamento hormonal por pelo menos 90 dias prévio ao tratamento cirúrgico, profundidade dos implantes de endometriose (se < ou > 5mm).

Foram selecionadas as topografias mais frequentemente acometidos por endometriose: ligamento útero sacro, fossas ovarianas, fundo de saco anterior e/ou posterior (implantes peritoneais) e ovários.

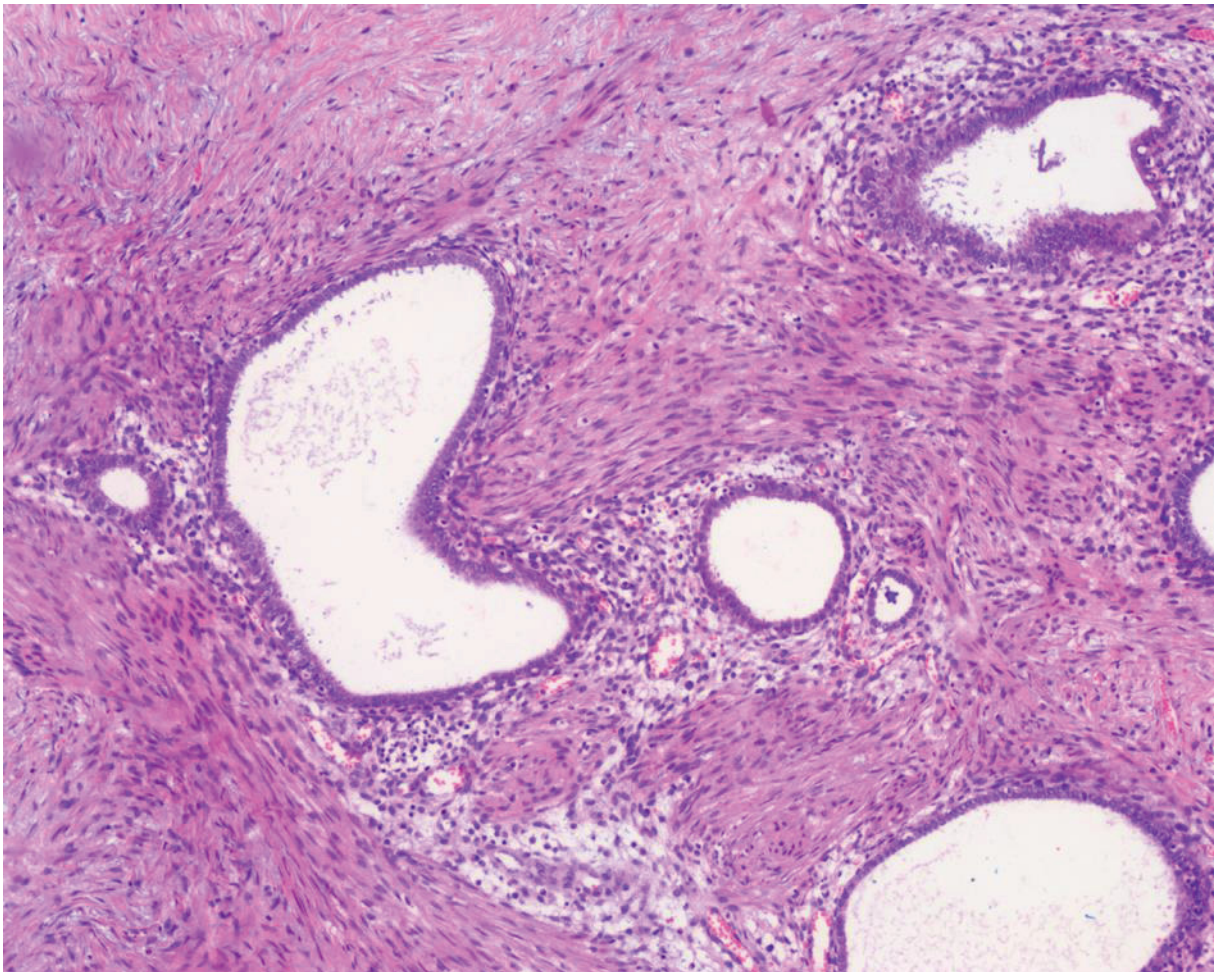
Os Critérios de inclusão foram: pacientes na menacme, com dor pélvica, infertilidade ou diagnóstico presumido de endometriose através de exames complementares (mapeamento de endometriose ou ressonância magnética da pelve) que foram submetidas a tratamento cirúrgico com anátomo-patológico confirmatório de endometriose.

Os Critérios de exclusão foram: diagnóstico de outras afecções uterinas (adenomiose, miomatose uterina).

### 3.3 PROCESSAMENTO DO MATERIAL E IMUNOHISTOQUÍMICA

Os espécimes cirúrgicos foram acondicionados em formalina 10% tamponada. Das áreas de interesse, foram coletadas amostras que foram submetidas a processamento histológico. De cada bloco foi realizado corte histológico de 4  $\mu$ m, sendo as lâminas coradas inicialmente pelo método de HE – hematoxilina e eosina para detecção e confirmação dos focos endometrióticos (FIGURA 3).

FIGURA 3 – GLÂNDULA E ESTROMA ENDOMETRIAL (SETAS VERDES) EM MEIO A TECIDO FIBROSO COM COLORAÇÃO HE, EM AUMENTO DE 100X

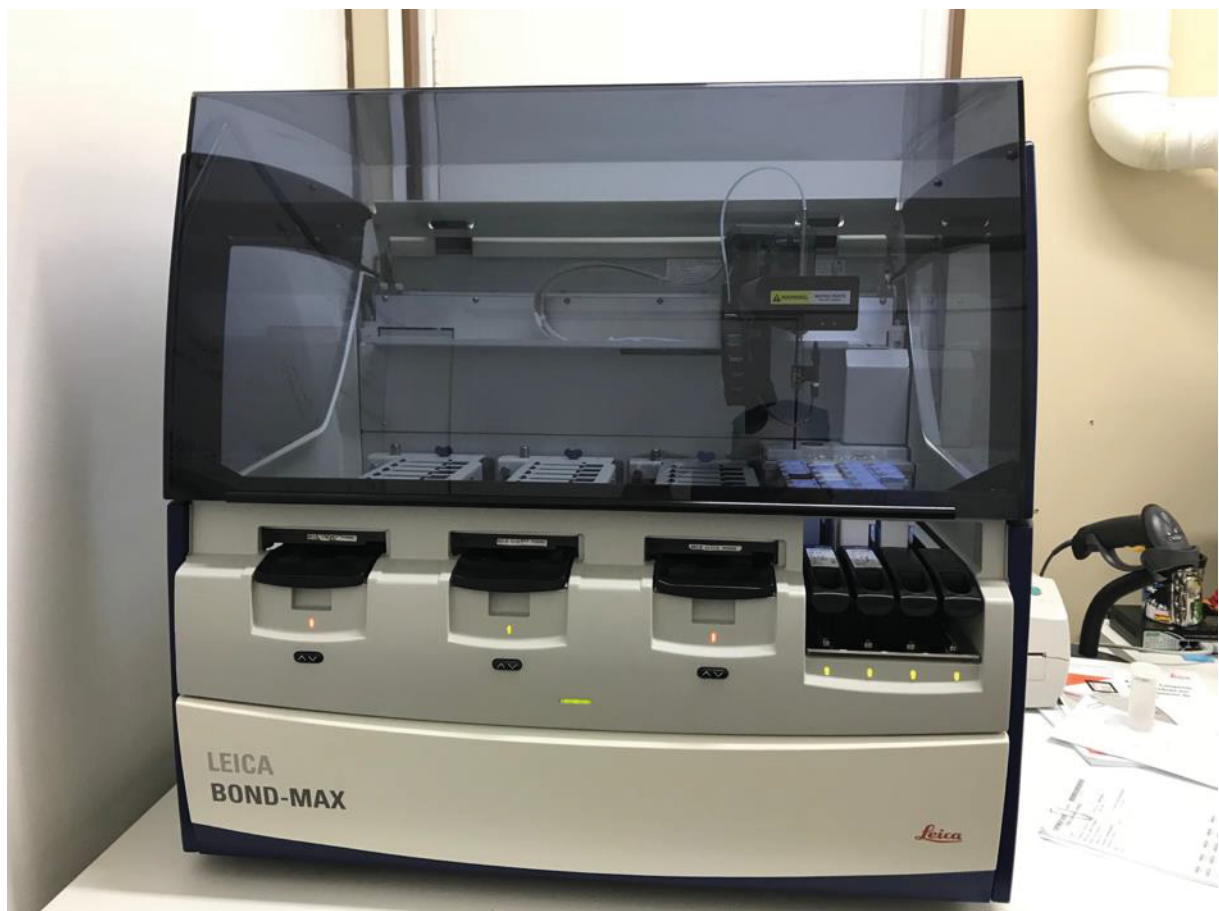


FONTE: NEOPATH (2019).



Posteriormente foram confeccionados cortes adicionais com a mesma espessura que foram dispostos em lâminas previamente silanizadas para processamento imunohistoquímico. As peças foram analisadas após o processamento imunohistoquímico tanto para a avaliação dos receptores hormonais como para as fibras nervosas. Para avaliação imunohistoquímica, a reação foi realizada inteiramente no imunoprocessador automatizado LEICA BOND-MAX (FIGURA 4). Em anexo, técnica de imunohistoquímica convencional (Anexo 3).

FIGURA 4 – IMUNOPROCESSADOR LEICA



FONTE: O autor (2019).

Esse processo permite avaliar e quantificar a presença de receptores hormonais (RE e RP) e a identificação das fibras nervosas. Os anticorpos utilizados foram o anticorpo policlonal de coelho PGP 9,5 (Anti-PGP 9.5, Dako, referencia Z5116) (diluição 1:1200) para fibras nervosas (FIGURA 5); anti-receptor de progesterona de rato (clone 16 Leica – pronto para uso) (FIGURA 6) e anti receptor de estrogênio de coelho (clone SP1 Roche/Ventana – pronto para uso) (FIGURA 7).

Foi, então, realizada subsequentemente a leitura das lâminas.

### 3.4 EXPRESSÃO DOS RECEPTORES HORMONAIS RE E RP

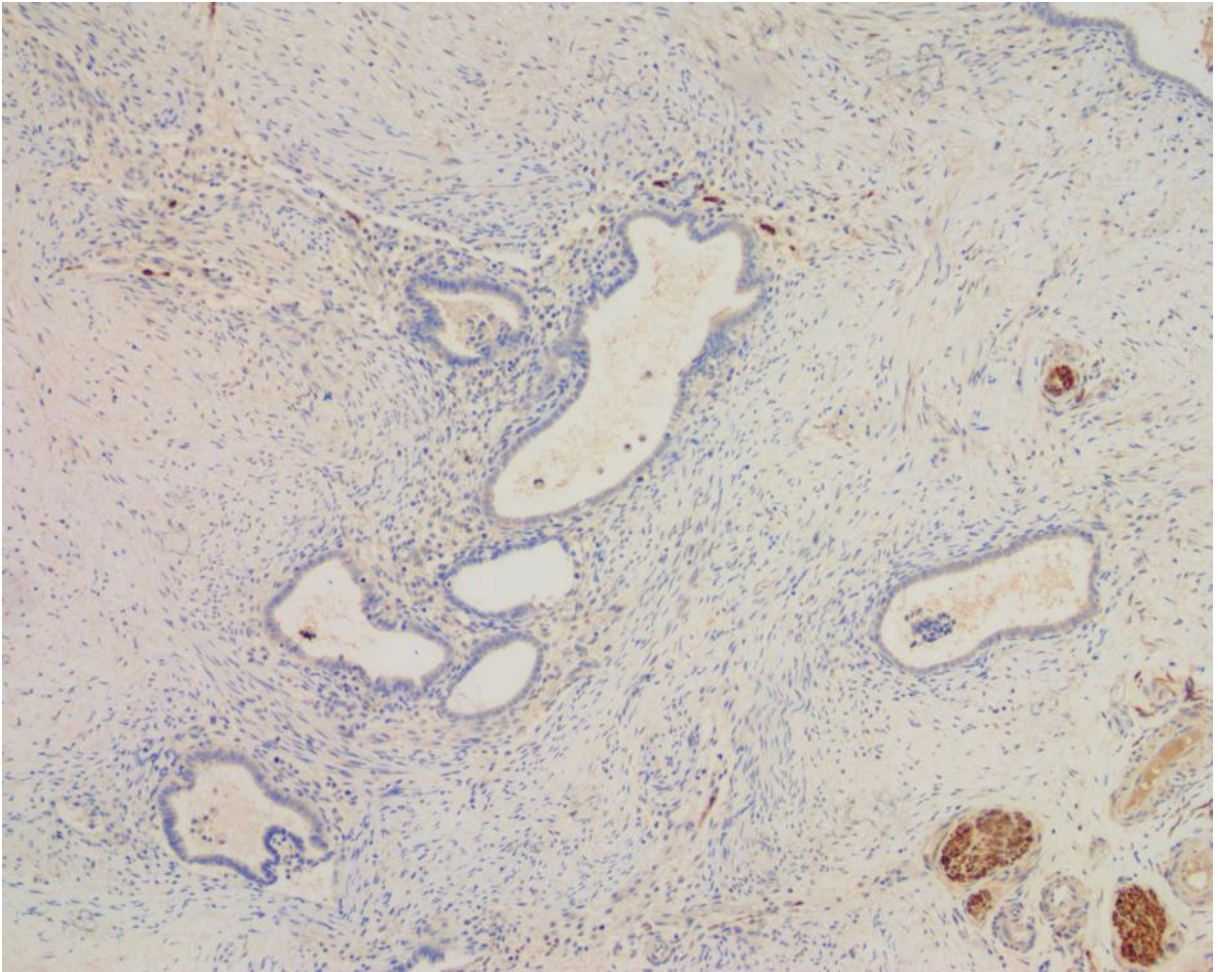
Os receptores de estrogênio e progesterona foram avaliados em relação a quantidade de células marcadas (%) e na intensidade da marcação (ausente, discreta/moderada e forte) tanto no componente estromal como glandular (+/3+, ++/3+, +++/3+), utilizando o score Allred. O score final foi calculado para cada amostra. Esse score foi obtido através do produto da intensidade e frequência dos scores, e categorizados da seguinte forma: negativo (scores 0-1), fraco (2-4), moderado (5-8) e forte (9-12) (FIGURA 5).

FIGURA 5 – CÁLCULO DO SCORE DE ALLRED

Negativa: 0	0: < 1%
Fraca: 1	1: 1 a 10%
Moderada: 2	2: 11 a 50%
Forte: 3	3: 51 a 90%
	4: >90%
<b>Score Final</b>	<b>IXF</b>

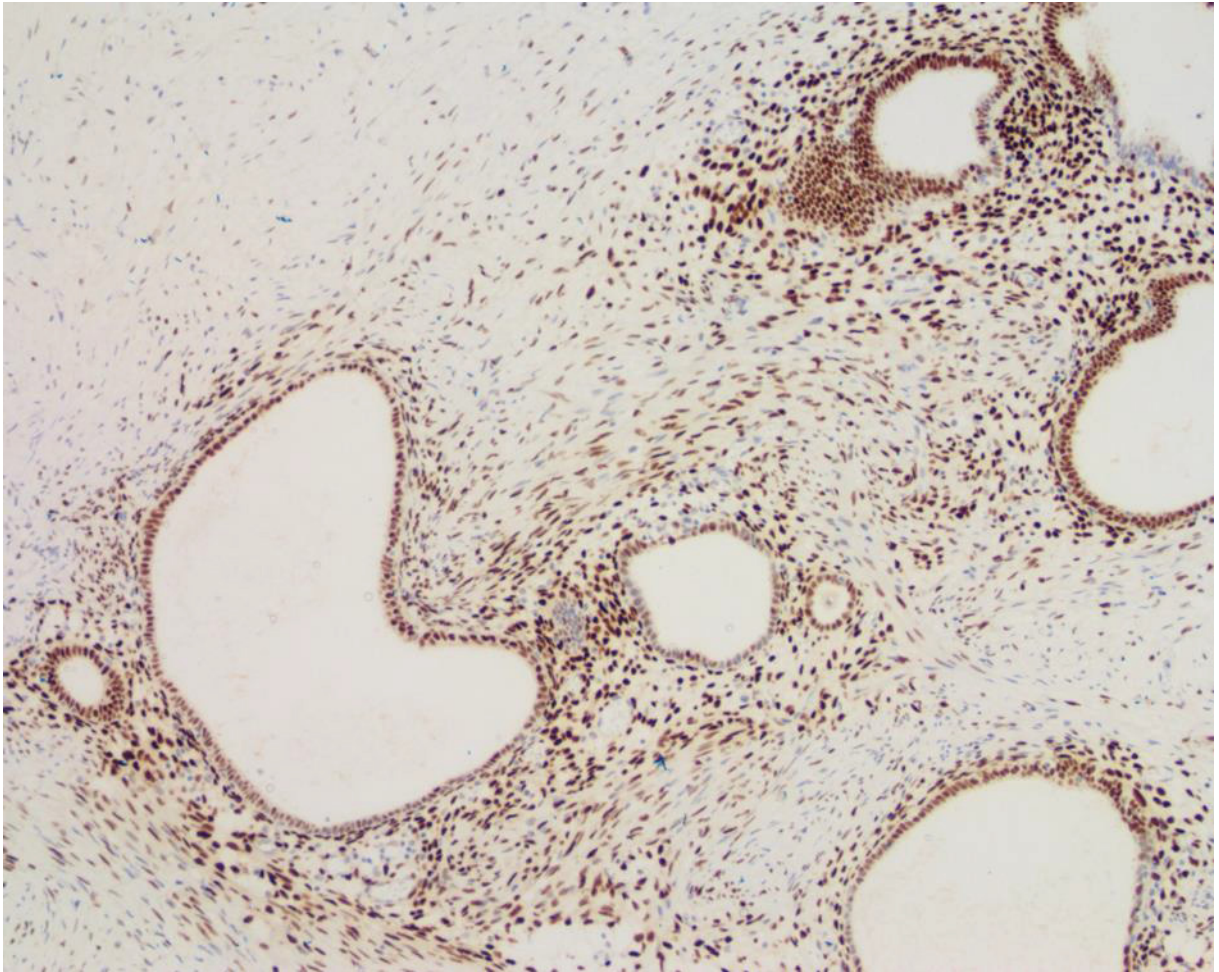
FONTE: O autor (2019).

FIGURA 6 – FIBRAS NERVOSAS IDENTIFICADAS EM IMPLANTES DE ENDOMETRIOSE (SETAS VERMELHAS) APÓS IMUNOHISTOQUÍMICA COM PGP 9,5, EM AUMENTO DE 100X



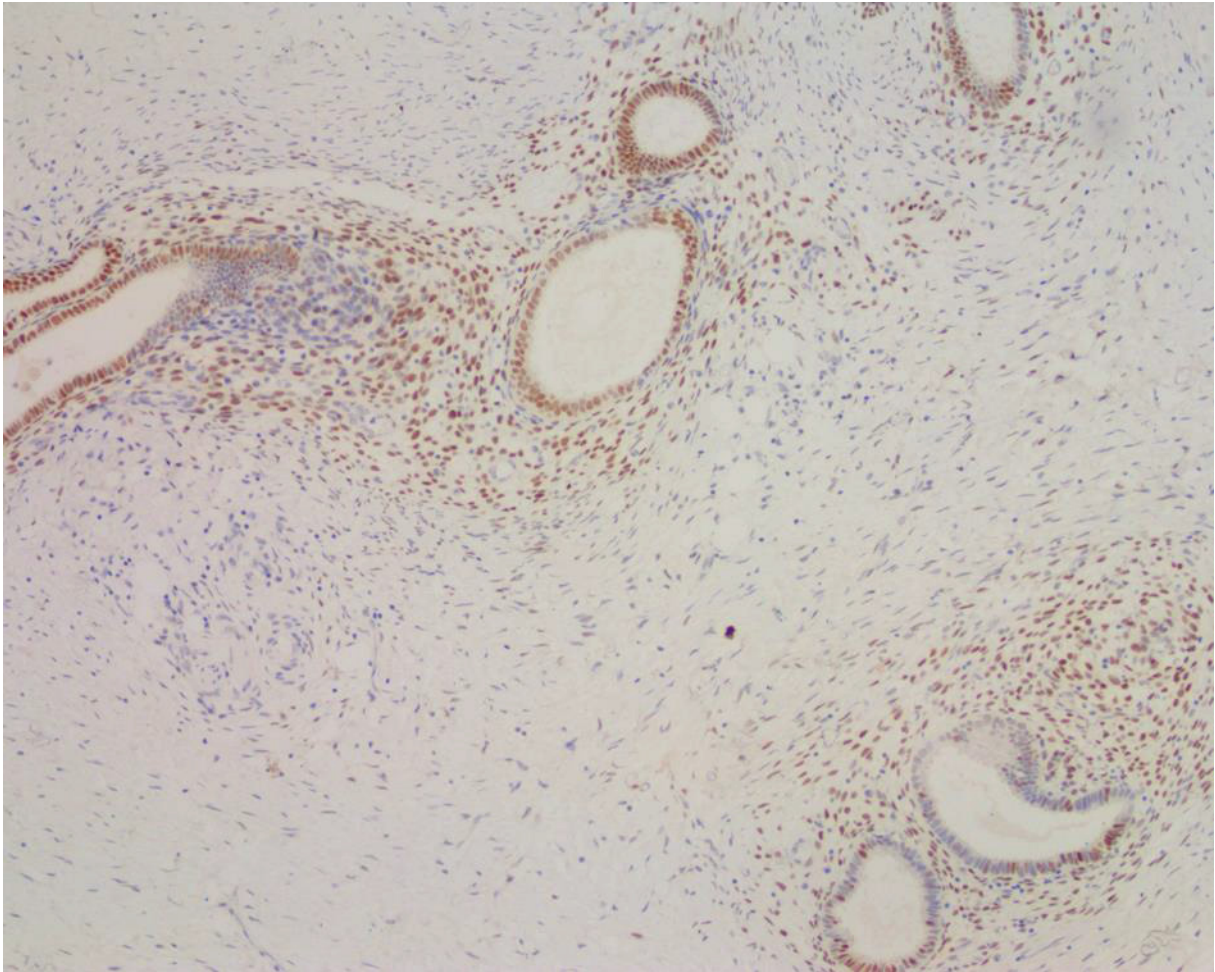
FONTE: NEOPATH (2019).

FIGURA 7 – IMPLANTE DE ENDOMETRIOSE APÓS IMUNOHISTOQUÍMICA PARA RP (RECEPTOR PROGESTERONA) – NÚCLEOS AMARRONADOS, EM AUMENTO DE 100X



FONTE: NEOPATH (2019).

FIGURA 8 – IMPLANTE DE ENDOMETRIOSE APÓS IMUNOHISTOQUÍMICA PARA RE (RECEPTOR ESTROGÊNIO) – NÚCLEOS AMARRONADOS, EM AUMENTO DE 100X



FONTE: NEOPATH (2019).

### 3.5 AVALIAÇÃO DAS FIBRAS NERVOSAS

A quantificação das fibras nervosas foi feita através da avaliação das reações ao anticorpo policlonal de coelho PGP 9,5. O produto gênico proteico 9,5 é uma proteína citoplasmática presente em neurônios e fibras nervosas em todos os níveis do sistema nervoso central e periférico e é capaz de identificar populações e substratos de diversos tipos de nervos diferentes. Foi originalmente isolado em extratos de tecido cerebral, e tem sido extensamente utilizado em pesquisas na ginecologia, em especial em endometriose, devido a sua capacidade de identificação de diversos tipos de fibras nervosas. Após a varredura da lâmina com a identificação do foco de endometriose, foi contado o número de fibras nervosas por campo de grande aumento (400x), no local onde a presença de fibras nervosas era mais expressiva.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis avaliadas foram a presença de fibras nervosas nos implantes de endometriose e a expressão dos receptores hormonais nesses implantes.

Os resultados foram descritos por mediana, valores mínimos e máximos. Para a comparação dos grupos definidos pelo uso de hormônio, em relação às variáveis relativas aos receptores e fibras, foi usado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. A comparação entre as topografias das lesões, em cada grupo, foi feita usando-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Stata/SE v.14.1. StataCorpLP, USA.

## 4 RESULTADOS

A análise apresentada a seguir foi realizada com base nos dados de 67 mulheres na menacme avaliadas quanto a fibras nervosas e receptores hormonais em implantes de endometriose de diferentes topografias (fossas ovarianas - FO, fundo de saco anterior - FSA, fundo de saco posterior - FSP, ligamentos úterossacos - LUS e Ovário). Dentre as 67 pacientes, 70,15% não estavam em uso de tratamento hormonal previamente a cirurgia e 29,85% estavam em uso de hormônios por pelo menos 90 dias antes da cirurgia. Considerando-se que nem todas as pacientes foram avaliadas em cada uma das topografias, para as análises, foram incluídos os dados válidos de cada variável. No total, foram analisados 156 implantes endometrióticos de diferentes topografias, conforme disposto no fluxograma (FIGURA 8).

Com relação a classificação das lesões, 44,87% dos implantes eram superficiais (<5mm de profundidade) e 55,13% eram profundos (>ou igual 5mm de profundidade). Embora a maioria das lesões na topografia dos ligamentos útero-sacos encontradas eram implantes profundos, não houve diferença estatística quanto às fibras nervosas nos implantes superficiais X profundos em qualquer topografia analisada (TABELA 1).

As pacientes apresentavam idade entre 25 e 44 anos, com média de idade de 33,79 anos.

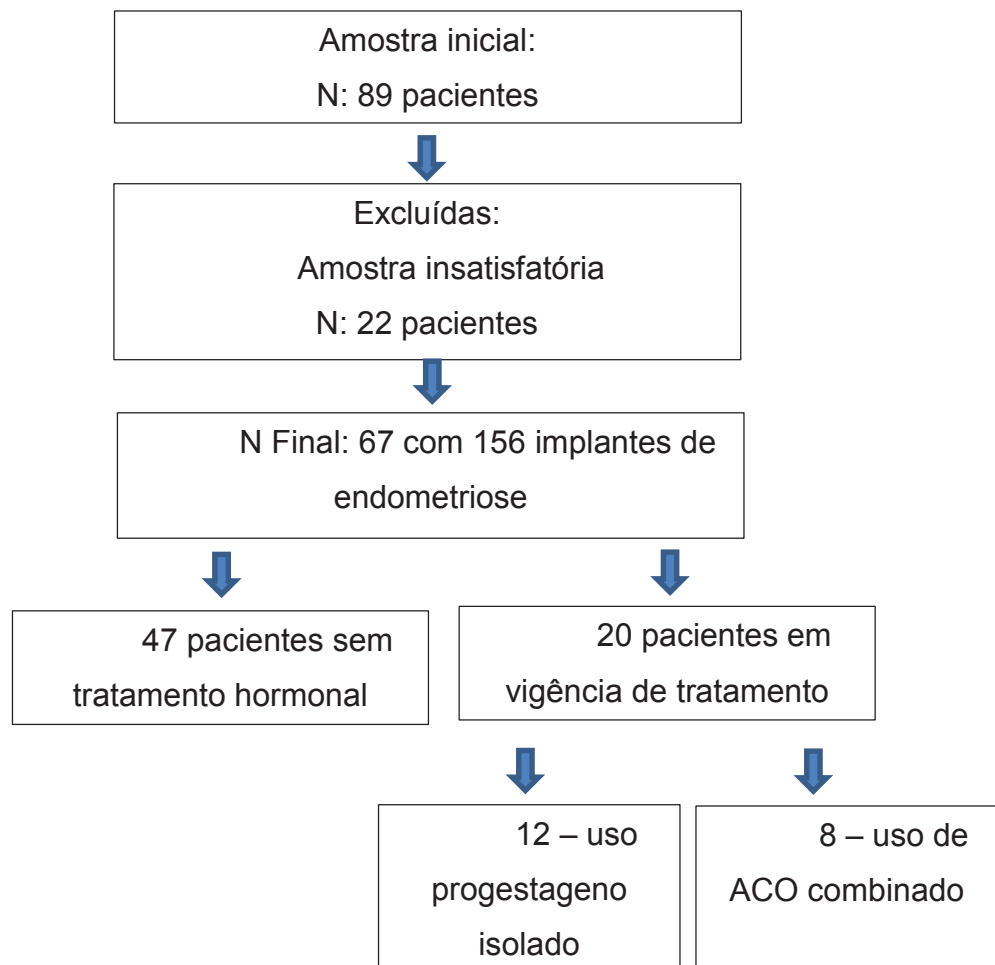
O número absoluto de peças analisadas de acordo com a topografia foram:

Fossas ovarianas: 39; Fundo de saco anterior: 35; Fundo de saco posterior: 11; Ligamentos uterossacos: 49 e Ovário: 22 (TABELA 2).

Com relação ao tratamento hormonal, das 20 pacientes que estavam em vigência do mesmo, 15 pacientes estavam em uso de progestágenos isolados – 12 em uso de dienogeste 2 mg e 3 em uso de desogestrel 75 mcg, e 5 pacientes em uso de anticoncepcionais orais combinados.

Em relação a indicação da cirurgia, em 61,2% das pacientes a cirurgia foi indicada por dor + infertilidade e somente em uma minoria dos casos – 7,16%, as pacientes apresentavam somente quadro clínico de infertilidade. No total, 5 pacientes apresentavam somente queixa de infertilidade, 41 pacientes apresentarem uma associação de infertilidade associado a dor pélvica/dismenorreia importante e 21 pacientes com dor pélvica/dismenorreia.

FIGURA 9 – FLUXOGRAMA COM NÚMERO TOTAL DE PACIENTES DIVISÃO DE ACORDO COM USO DE TRATAMENTO HORMONAL



FONTE: O autor (2019).



TABELA 1 – COMPARAÇÃO DAS FIBRAS NERVOSAS DE ACORDO COM A TOPOGRAFIA E PROFUNDIDADE DA LESÃO

	Variável	Profund.	n	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
FO	FO – Fibras nervosas	< 0,5	21	1	0	5	0,192
		≥ 0,5	18	1,5	0	12	
FSA	FSA – Fibras nervosas	< 0,5	15	1	0	14	0,259
		≥ 0,5	20	3	0	11	
FSP	FSP – Fibras nervosas	< 0,5	4	1	0	5	-
		≥ 0,5	7	1	0	4	
LUS	LUS – Fibras nervosas	< 0,5	8	6	0	20	0,781
		≥ 0,5	41	6	0	80	

\*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney,  $p < 0,05$

FONTE: O autor (2019).

OBS: todos os implantes ovarianos foram considerados profundos.

TABELA 2 – NÚMERO TOTAL DE IMPLANTES DE ENDOMETRIOSE EM CADA TOPOGRAFIA ANALISADA

<b>TOPOGRAFIA</b>	<b>NÚMERO DE PEÇAS</b>
Fossas Ovarianas	39
Fundo de Saco Anterior	35
Fundo de Saco Posterior	11
Ligamentos Útero-sacros	49
Ovário	22
<b>TOTAL</b>	<b>156</b>

FONTE: O autor (2019).

#### 4.1 COMPARAÇÃO DOS GRUPOS DEFINIDOS PELO HORMÔNIO (NÃO E SIM) EM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS AVALIADAS

Para cada uma das variáveis, cada local de lesão, testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais para os dois grupos, versus a hipótese alternativa de que os resultados são diferentes. Nas tabelas abaixo estão representados os resultados das topografias com  $n > 4$  para cada local. (TABELAS 3, 4, 5 e 6).

TABELA 3 – COMPARAÇÃO DAS FIBRAS NERVOSAS (NÚMERO DE FIBRAS) E RECEPTORES HORMONAIIS (ESCORE DE ALLRED) NOS GRUPOS COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL NA FOSSA OVARIANA (FO)

Variável	Hormônio	n	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
FO - RECEPTOR ESTROGENIO	Não	27	2	0	12	0,323
	Sim	12	4	1	9	
FO - RECEPTOR PROGESTERONA	Não	27	9	0	12	0,776
	Sim	12	11	0	12	
FO - FIBRAS NERVOSAS	Não	27	1	0	12	0,518
	Sim	12	1	0	5	

\*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney,  $p < 0,05$

FONTE: O autor (2019).

TABELA 4 – COMPARAÇÃO DAS FIBRAS NERVOSAS (NÚMERO DE FIBRAS) E RECEPTORES HORMONAIIS (ESCORE DE ALLRED) NOS GRUPOS COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL NO FUNDO DE SACO ANTERIOR (FSA)

Variável	Hormônio	n	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
FSA - RECEPTOR ESTROGENIO	Não	27	3	0	9	0,606
	Sim	8	4	0	12	
FSA - RECEPTOR PROGESTERONA	Não	27	9,0	2	12	0,735
	Sim	8	10,5	4	12	
FSA - FIBRAS NERVOSAS	Não	27	2	0	14	0,832
	Sim	8	1,5	1	8	

\*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney,  $p < 0,05$

FONTE: O autor (2019).

TABELA 5 – COMPARAÇÃO DAS FIBRAS NERVOSAS (NÚMERO DE FIBRAS) E RECEPTORES HORMONAIIS (ESCORE DE ALLRED) NOS GRUPOS COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL NOS LIGAMENTOS ÚTERO-SACROS (LUS)

Variável	Hormônio	n	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
LUS - RECEPTOR ESTROGENIO	Não	34	4	0	12	0,099
	Sim	15	6	2	12	
LUS - RECEPTOR PROGESTERONA	Não	34	12	4	12	0,959
	Sim	15	10,5	4	12	
LUS - FIBRAS NERVOSAS	Não	34	7	0	80	0,223
	Sim	15	3	0	22	

\*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney,  $p < 0,05$

FONTE: O autor (2019).

TABELA 6 – COMPARAÇÃO DAS FIBRAS NERVOSAS (NÚMERO DE FIBRAS) E RECEPTORES HORMONAIIS (ESCORE DE ALLRED) NOS GRUPOS COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL NOS OVÁRIOS

Variável	Hormônio	n	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
OVARIO - RECEPTOR ESTROGENIO	Não	14	6	0	9	0,144
	Sim	8	6	3	12	
OVARIO - RECEPTOR PROGESTERONA	Não	14	12	0	12	0,765
	Sim	8	9	0	12	
OVARIO - FIBRAS NERVOSAS	Não	14	0	0	4	0,297
	Sim	8	0	0	0	

\*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney,  $p < 0,05$

FONTE: O autor (2019).

Não houve diferença na expressão dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona e nem da quantidade de fibras nervosas comparando o grupo que estava em vigência do tratamento hormonal prévio a cirurgia com o grupo que não fez uso do tratamento hormonal.

## 4.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS TOPOGRAFIAS DE LESÃO, DENTRO DE CADA GRUPO

Para cada uma das variáveis, para cada um dos grupos definidos pelo uso de hormônios, para cada duas topografias de implantes comparados, testou-se a hipótese nula de que os resultados são iguais nas duas topografias, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes.

Considerando-se a estrutura de pareamento dos dados (as mesmas topografias foram avaliadas na mesma paciente), para esta análise foram incluídos os casos com dados completos nas duas topografias sob comparação. Nas tabelas abaixo são apresentadas estatísticas descritivas das variáveis e valores de p dos testes estatísticos.

Não foram aplicados testes estatísticos para variáveis com menos de 4 casos ou quando os dados foram iguais na maioria dos casos, inviabilizando a aplicação do teste.

## 4.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS TOPOGRAFIAS DE UMA MESMA PACIENTE COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL

Comparação das fibras nervosas dos ligamentos uterossacros com a fossa ovariana (TABELA 7, FIGURA 9 e 10).

TABELA 7 – COMPARAÇÃO DE IMPLANTE DE ENDOMETRIOSE COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL NA FOSSA OVARIANA X LIGAMENTO ÚTERO-SACRO EM UMA MESMA PACIENTE

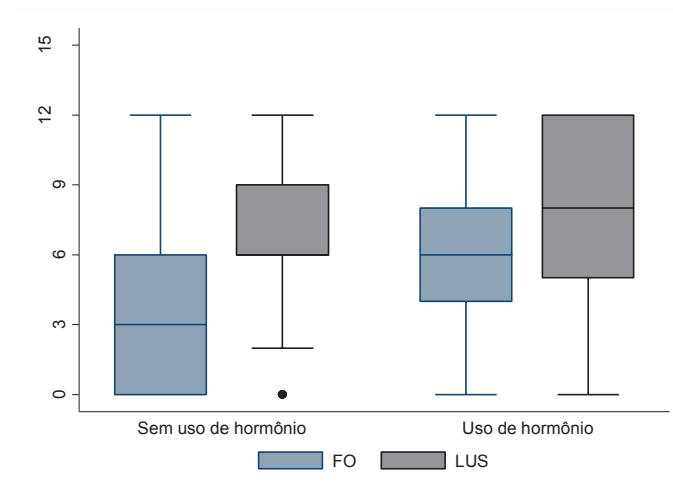
	Local	n	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
<b>Hormônio não</b>						
RECEPTOR ESTROGENIO	FO	19	2	0	9	0,289
	LUS	19	4	0	12	
RECEPTOR PROGESTERONA	FO	19	9	0	12	0,508
	LUS	19	12	4	12	
FIBRAS NERVOSAS	FO	19	1	0	5	0,001
	LUS	19	7	0	80	
<b>Hormônio sim</b>						
RECEPTOR ESTROGENIO	FO	10	4	1	9	0,183
	LUS	10	6	2	9	
RECEPTOR PROGESTERONA	FO	10	10,5	4	12	0,465
	LUS	10	9	6	12	
FIBRAS NERVOSAS	FO	10	2	0	5	0,086
	LUS	10	3,5	1	22	

\*Teste não-paramétrico de Wilcoxon,  $p < 0,05$

FONTE: O autor (2019).

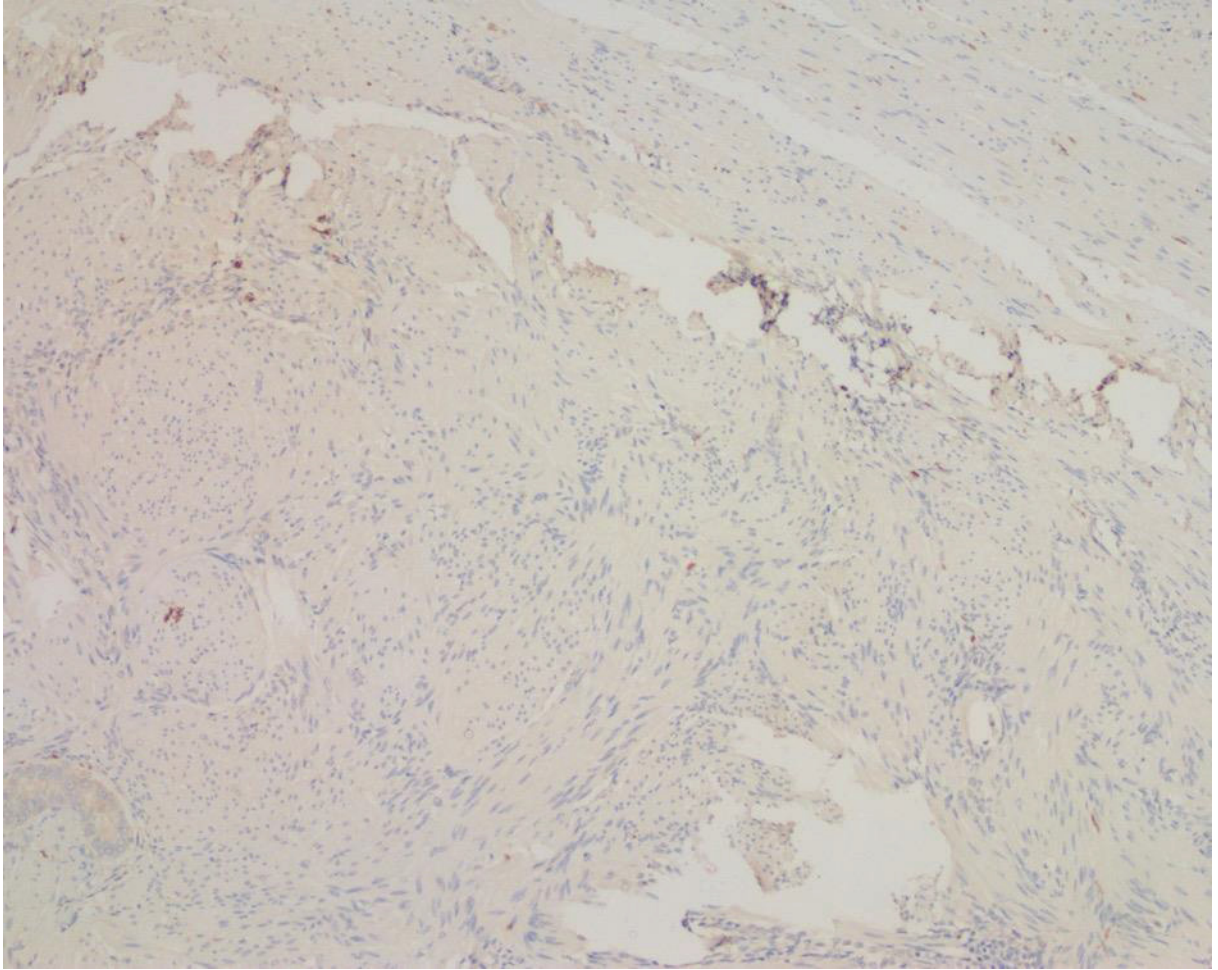
Ao comparar as fibras nervosas presentes nos implantes de endometriose nas fossas ovarianas e ligamentos útero-sacros de uma mesma paciente com tratamento hormonal X sem tratamento hormonal, foi observado uma redução nas fibras nervosas dos ligamentos útero-sacros das pacientes que estavam em uso de tratamento hormonal. Esta redução foi estatisticamente significativa. Por outro lado, não foi observado diferenças na comparação dos receptores hormonais nos grupos com e sem o tratamento hormonal.

FIGURA 10 – NO GRÁFICO ACIMA, COMPARAMOS AS FIBRAS NERVOSAS NOS LIGAMENTOS ÚTERO-SACROS E FOSSAS OVARIANAS NOS GRUPOS COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL, E OBSERVA-SE UMA MENOR QUANTIDADE DE FIVRAS NERVOSAS NO GRUPO TRATADO COM HORMÔNIO NOS LIGAMENTOS ÚTERO-SACROS



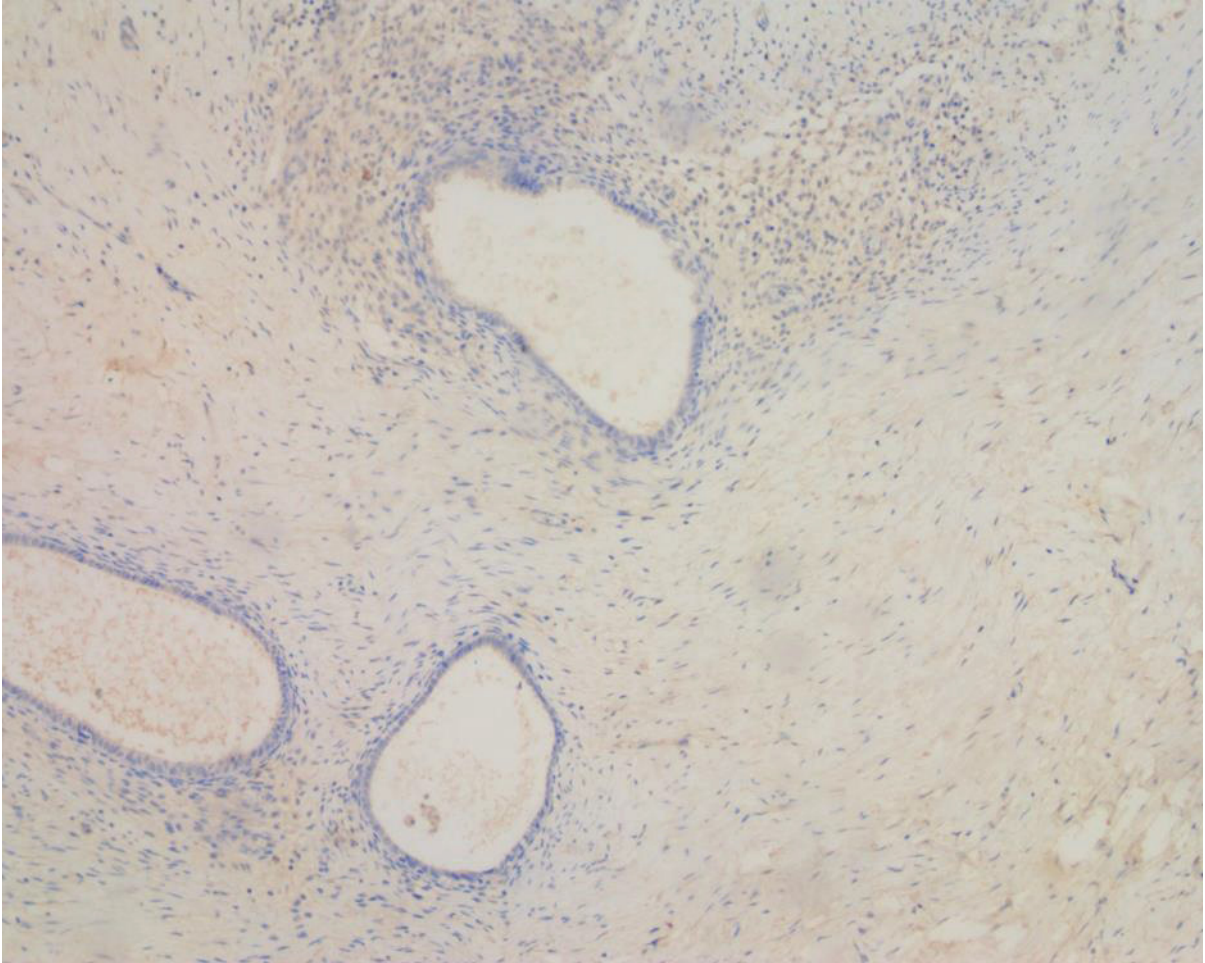
FONTE: O autor (2019).

FIGURA 11 – IMPLANTE DE ENDOMETRIOSE COM PRESENÇA DE FILETES NERVOSOS IDENTIFICADOS COM PGP 9,5 (SETAS), AUMENTO DE 100X



FONTE: NEOPATH (2019).

FIGURA 12 – IMPLANTE DE ENDOMETRIOSE SEM PRESENÇA DE FILETES NERVOSOS, AUMENTO 100X



FONTE: NEOPATH (2019).

Comparação das fibras nervosas das demais topografias avaliadas (TABELAS 8, 9, 10 e 11).

TABELA 8 – COMPARAÇÃO DE IMPLANTE DE ENDOMETRIOSE COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL NA FOSSA OVARIANA E FUNDO DE SACO ANTERIOR EM UMA MESMA PACIENTE

	Local	n	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
<b>Hormônio não</b>						
RECEPTOR ESTROGENIO	FO	14	3,5	0	9	0,575
	FSA	14	4	0	9	
RECEPTOR PROGESTERONA (estroma)	FO	14	9	6	12	0,249
	FSA	14	9	4	12	
FIBRAS NERVOSAS	FO	15	1	0	12	0,807
	FSA	15	2	0	10	
<b>Hormônio sim</b>						
RECEPTOR ESTROGENIO	FO	5	4	2	9	0,273
	FSA	5	9	2	12	
RECEPTOR PROGESTERONA	FO	5	12	9	12	-
	FSA	5	12	9	12	
FIBRAS NERVOSAS	FO	5	1	1	3	0,144
	FSA	5	4	1	8	

\*Teste não-paramétrico de Wilcoxon,  $p < 0,05$

FONTE: O autor (2019).

TABELA 9 – COMPARAÇÃO DE IMPLANTE DE ENDOMETRIOSE COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL NA FOSSA OVARIANA X OVÁRIO EM UMA MESMA PACIENTE

	Local	n	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
<b>Hormônio não</b>						
RECEPTOR ESTROGENIO	FO	7	6	2	12	0,345
	Ovario	7	6	0	9	
RECEPTOR PROGESTERONA	FO	7	12	6	12	0,109
	Ovario	7	9	0	12	
FIBRAS NERVOSAS	FO	6	4,5	0	12	0,043
	Ovario	6	0	0	3	
<b>Hormônio sim</b>						
RECEPTOR ESTROGENIO	FO	4	3,5	1,0	6,0	0,109
	Ovario	4	6	3	9	
RECEPTOR PROGESTERONA	FO	5	4	0	12	0,109
	Ovario	5	9	9	12	
FIBRAS NERVOSAS	FO	5	1	0	4	0,109
	Ovario	5	0	0	0	

\*Teste não-paramétrico de Wilcoxon,  $p < 0,05$

FONTE: O autor (2019).

Ao comparar os implantes das fossas ovarianas com os ovários, houve uma redução significativa no número de fibras nervosas no grupo com tratamento hormonal.

TABELA 10 – COMPARAÇÃO DE IMPLANTE DE ENDOMETRIOSE COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL NO FUNDO DE SACO ANTERIOR X LIGAMENTO ÚTERO-SACRO

	Local	n	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
<b>Hormônio não</b>						
RECEPTOR ESTROGENIO	FSA	18	3,5	0	9	0,300
	LUS	18	4	0	12	
RECEPTOR PROGESTERONA	FSA	18	9	2	12	0,735
	LUS	18	12	4	12	
FIBRAS NERVOSAS	FSA	18	3	1	14	0,031
	LUS	18	7,5	0	80	
<b>Hormônio sim</b>						
RECEPTOR ESTROGENIO	FSA	8	4	0	12	0,673
	LUS	8	4	2	9	
RECEPTOR PROGESTERONA	FSA	8	10,5	4	12	0,715
	LUS	8	9	4	12	
FIBRAS NERVOSAS	FSA	7	2	1	8	0,554
	LUS	7	3	0	10	

\*Teste não-paramétrico de Wilcoxon,  $p < 0,05$

FONTE: O autor (2019).

Ao comparar as fibras nervosas presentes nos implantes de endometriose no fundo de saco anterior e ligamentos útero-sacros de uma mesma paciente com tratamento hormonal X sem tratamento hormonal, foi observado uma redução nas fibras nervosas nos ligamentos útero-sacros das pacientes que estavam em uso de tratamento hormonal. Esta redução foi estatisticamente significativa. Por outro lado, não foi observado diferenças na comparação dos receptores hormonais nos grupos com e sem o tratamento hormonal.

TABELA 11 – COMPARAÇÃO DE IMPLANTE DE ENDOMETRIOSE COM E SEM TRATAMENTO HORMONAL NO LIGAMENTO ÚTERO-SACRO X OVÁRIO

	Local	n	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
<b>Hormônio não</b>						
RECEPTOR ESTROGENIO	LUS	9	4	2	9	0,463
	Ovário	9	6	2	6	
RECEPTOR PROGESTERONA	LUS	9	12	6	12	0,686
	Ovário	9	12	9	12	
FIBRAS NERVOSAS	LUS	9	6	0	80	0,028
	Ovário	9	0	0	2	
<b>Hormônio sim</b>						
RECEPTOR ESTROGENIO	LUS	6	6	2	12	0,465
	Ovário	6	5	3	8	
RECEPTOR PROGESTERONA	LUS	6	9	9	12	0,593
	Ovário	6	10,5	9	12	
FIBRAS NERVOSAS	LUS	5	2	0	10	0,068
	Ovário	5	0	0	0	

\*Teste não-paramétrico de Wilcoxon,  $p < 0,05$

FONTE: O autor (2019).



Ao comparar os implantes de endometriose dos ligamentos útero-sacos com as lesões ovarianas, foi observado novamente uma redução das fibras nervosas dos ligamentos útero-sacos nas pacientes que estavam em uso de tratamento hormonal.

#### 4.4 COMPARAÇÃO DOS RECEPTORES HORMONAIS DE ESTROGÊNIO E PROGESTERONA NAS DIFERENTES TOPOGRAFIAS

Para implante de endometriose, para cada local avaliado, testou-se a hipótese nula de que os resultados de estrogênio são iguais aos resultados de progesterona, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na tabela abaixo são apresentadas estatísticas descritivas dos hormônios de acordo com o local e os valores de p dos testes estatísticos (TABELA 12, FIGURAS 11 e 12).

TABELA 12 – COMPARAÇÃO DOS RECEPTORES HORMONAIS DE ESTROGÊNIO E PROGESTERONA NAS LESÕES ENDOMETRIÓTICAS

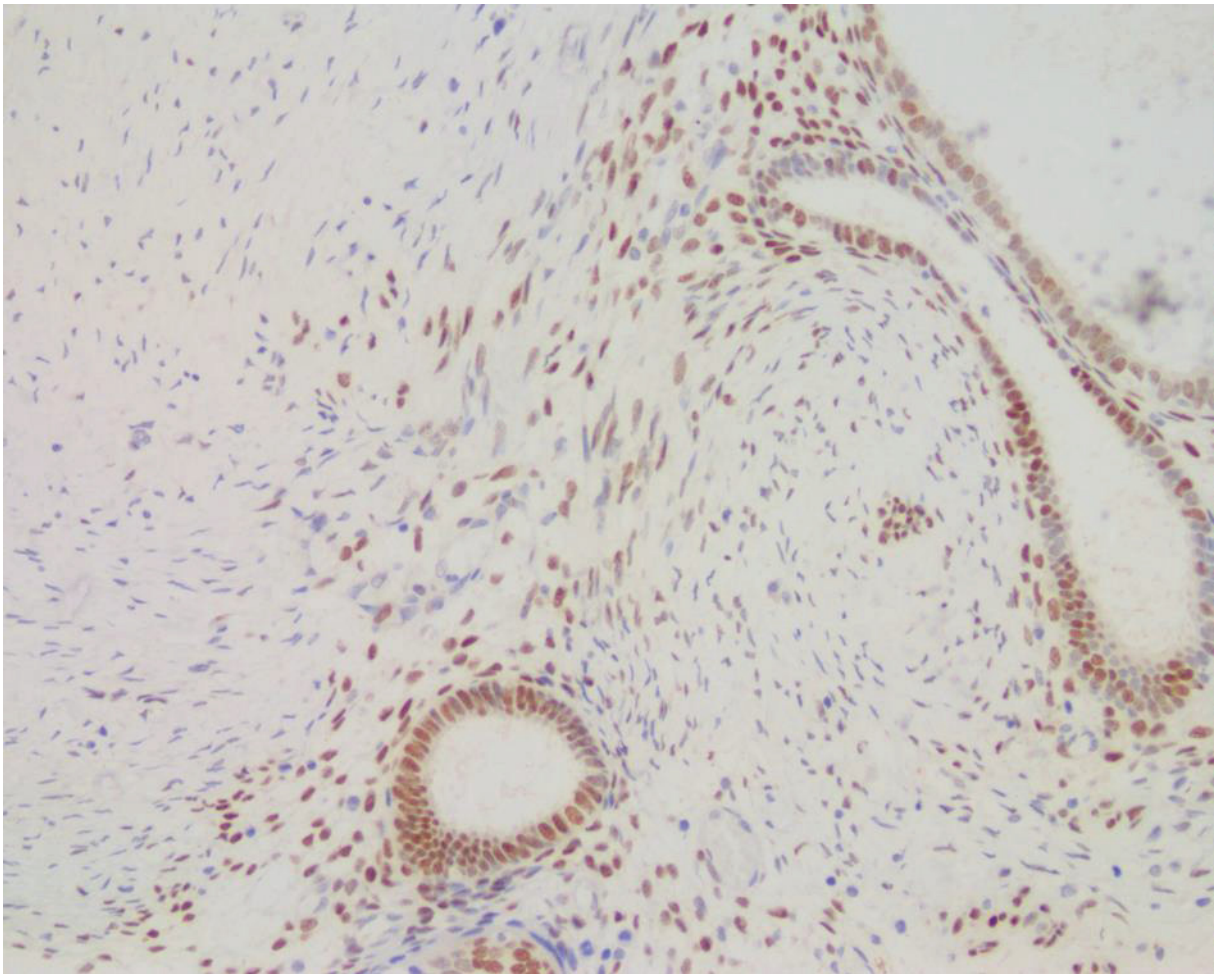
Variáveis	n	Mediana	Mínimo	Máximo	p*
FO - RECEPTOR ESTROGENIO	39	3,5	0	12	
FO - RECEPTOR PROGESTERONA	39	9	0	12	<0,001
FSA - RECEPTOR ESTROGENIO	35	3	0	12	
FSA - RECEPTOR PROGESTERONA	35	9	2	12	<0,001
FSP - RECEPTOR ESTROGENIO	11	2	0	9	
FSP - RECEPTOR PROGESTERONA	11	9	6	12	0,003
LUS - RECEPTOR ESTROGENIO	49	5	0	12	
LUS - RECEPTOR PROGESTERONA	49	12	4	12	<0,001
OVARIO - RECEPTOR ESTROGENIO	22	6	0	12	
OVARIO - RECEPTOR PROGESTERONA	22	9	0	12	<0,001

\*Teste não-paramétrico de Wilcoxon,  $p < 0,05$

FONTE: O autor (2019).

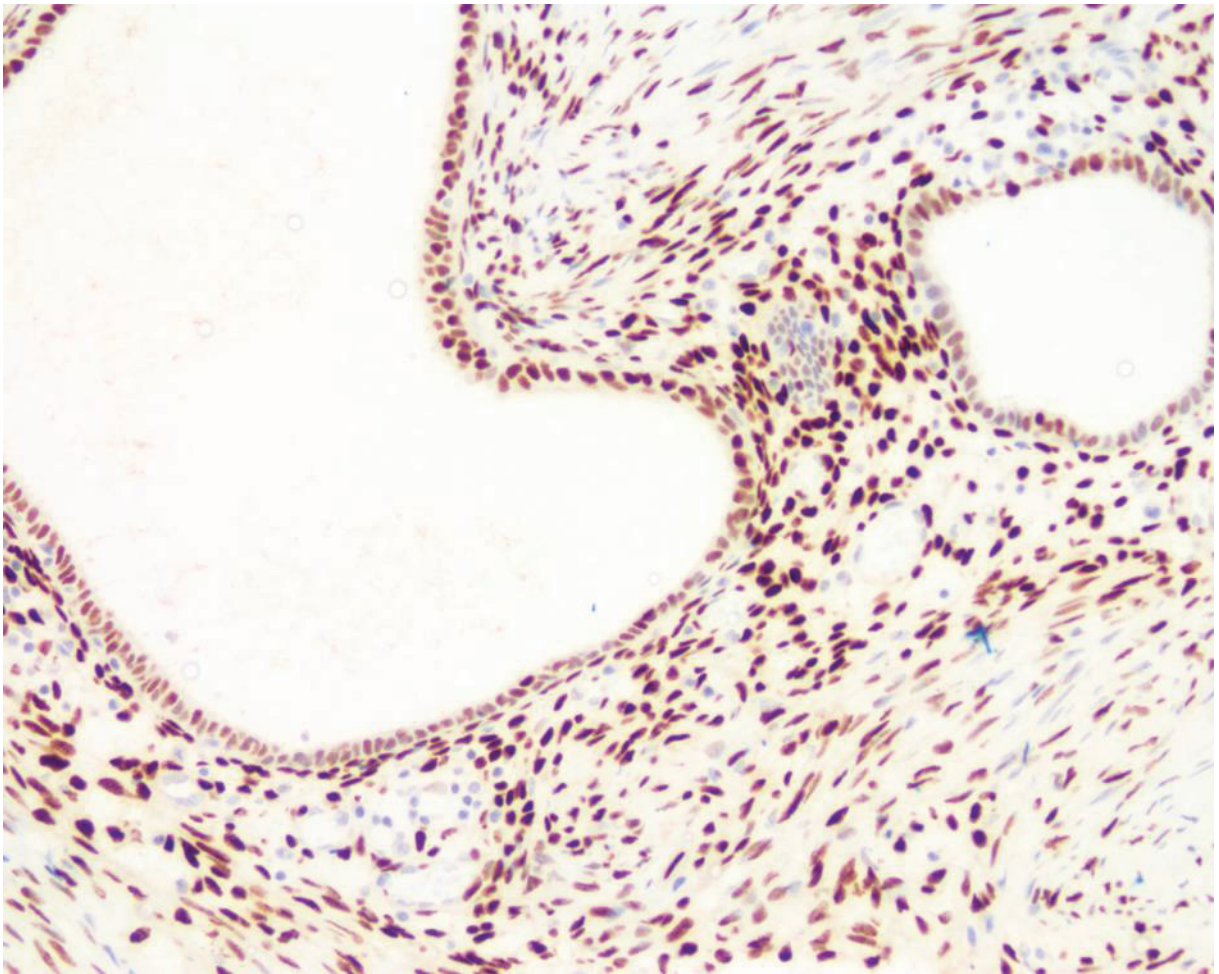
Ao analisar a expressão dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona nos implantes de endometriose das diferentes topografias, foi observado uma predominância expressiva e estatisticamente significativa dos receptores hormonais de progesterona sobre os receptores hormonais de estrogênio em todas as topografias analisadas.

FIGURA 13 – RECEPTORES HORMONAIS DE ESTROGÊNIO IDENTIFICADOS EM FOCO DE ENDOMETRIOSE POR IMUNOHISTOQUÍMICA (NÚCLEOS AMARRONADOS) EM AUMENTO DE 400X



FONTE: NEOPATH (2019).

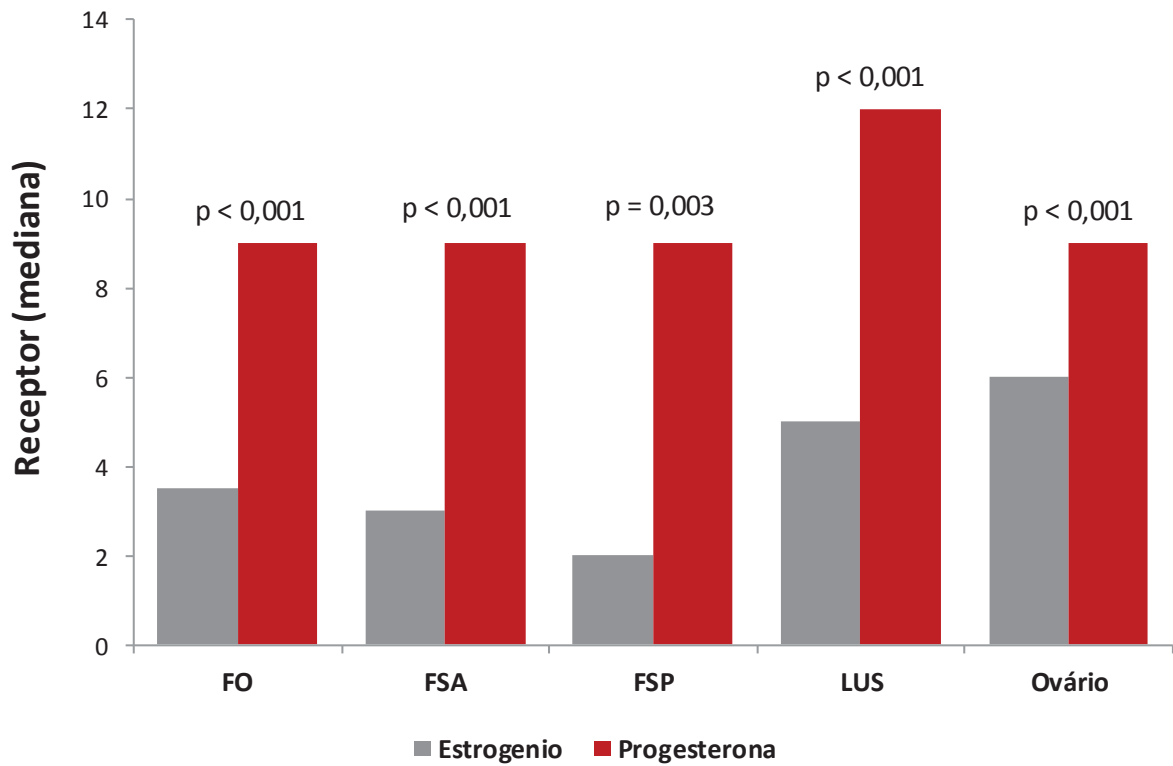
FIGURA 14 – RECEPTORES HORMONAIIS DE PROGESTERONA IDENTIFICADOS EM FOCO DE ENDOMETRIOSE POR IMUNOHISTOQUÍMICA (NÚCLEOS AMARRONADOS) EM AUMENTO DE 400X



FONTE: NEOPATH (2019).

FIGURA 15 – SCORE DE ALLRED DOS RECEPTORES HORMONAIIS DE ESTROGÊNIO E PROGESTERONA EM IMPLANTES DE ENDOMETRIOSE NAS DIFERENTES TOPOGRAFIAS

FONTE



FONTE: O autor (2019).

## 5 DISCUSSÃO

Diversos estudos foram realizados buscando identificar fibras nervosas no endométrio e/ou em lesões endometrióticas, seja com o intuito de buscar um possível marcador diagnóstico para endometriose como no primeiro caso, ou buscando correlacionar os sintomas de dor e a presença de fibras nervosas nessas lesões (Tokushige *et al.*, 2007; Zhang *et al.* 2009; Medina *et al.*, 2009; Ellett *et al.*, 2015). No entanto, uma possível interferência do uso de hormônios e suas repercussões nessas lesões ainda foi pouco estudado. Um dos pilares do tratamento da endometriose - que visa melhorar a dor e a qualidade de vida da paciente, inclui a utilização de hormônios - como progestágenos isolados ou anticoncepcionais orais combinados, como preconizado pelo Ministério da Saúde, segundo portaria de 2016. Diversos mecanismos estão implicados na gênese da dor nessas pacientes e a interferência do tratamento hormonal nessas lesões podem colaborar com a compreensão e no tratamento dessas pacientes.

Em nosso trabalho, foi identificado a presença de fibras nervosas em todas as topografias analisadas: fossa ovariana, fundo de saco anterior e posterior, ligamento útero-sacro e ovário. Tal fato está de acordo com a literatura, onde diversos trabalhos anteriores já demonstraram a presença de fibras nervosas em lesões endometrióticas. Ao analisar cada topografia separadamente, observamos que nos ovários (endometriomas) um número substancialmente menor de fibras nervosas foi encontrado - somente em 5 das 22 pacientes foram identificadas fibras nervosas. Estudos prévios demonstraram uma ausência de fibras nervosas em lesões ovarianas ou menor quantidade quando comparados a outros sítios de endometriose ou endometriose peritoneal. Al-fozan *et al.* (2004) pesquisaram fibras nervosas em lesões ovarianas – cisto dermóide e endometriomas, e não identificaram nenhuma fibra nervosa nessas lesões (AL-FOZAN *et al.*, 2004). Porém, estudos posteriores demonstraram a presença de fibras nervosas em alguns endometriomas e que tal fato poderia estar relacionado a dor pélvica nessas pacientes. Tokushigue *et al.* (2009) descreve a presença de fibras nervosas no endometrioma ovariano, utilizando o mesmo reagente PGP 9,5 para identificar as fibras nervosas nessa lesão. Ainda utilizando o mesmo marcador, Zhang *et al.* (2010) ao analisar amostras de 61 pacientes com endometriose ovariana, identificaram que o aumento da densidade das fibras nervosas nessas lesões estava

associada à maior quantidade de aderências pélvicas e dor nessas pacientes, enquanto em pacientes que apresentavam menos fibras nervosas (ou nenhuma fibra) tinham menos dor (ZHANG *et al.*, 2010).

Por outro lado, ao avaliar as fibras nervosas em cada topografia, ficou evidente que os implantes nos ligamentos útero-sacros apresentaram uma quantidade maior de fibras nervosas quando comparados às outras localizações. Em um estudo sobre anatomia e histologia dos ligamentos uterossacros, Ramanah *et al.* (2009) demonstraram que esse ligamento é constituído de tecido conjuntivo, fibras nervosas, vasos sanguíneos e tecido adiposo (RAMANAH *et al.*, 2009). Sendo assim, é esperado que identifiquemos algumas fibras nervosas nessas lesões. No entanto, a quantidade de fibras nervosas encontradas nessas lesões é sensivelmente superior as fibras nervosas identificadas nas outras localizações. Kelm *et al.* (2008) pesquisaram a presença de fibras nervosas em ligamentos uterossacros de pacientes com e sem endometriose e identificaram que a presença de fibras nervosas nos ligamentos das pacientes com endometriose era superior quando comparado a mesma topografia em pacientes sem endometriose (KELM *et al.*, 2008).

Em nosso trabalho, em uma avaliação inicial, o tratamento hormonal não influenciou a quantidade das fibras nervosas nos implantes de pacientes que estavam em uso de tratamento hormonal previamente a cirurgia quando comparados às pacientes que estavam sem hormônio em qualquer topografia isoladamente – ao menos com significância estatística. Dentre outros estudos, Tokushigue *et al.* (2009) demonstraram em estudo prévio que a densidade das fibras nervosas identificadas com o reagente PGP 9,5 foi menor em pacientes tratadas com hormônio (seja progestágeno isolado ou anticoncepcionais orais combinados) previamente a cirurgia quando comparadas às pacientes sem tratamento. Uma hipótese para a discordância de resultados pode ser a metodologia para quantificar as fibras nervosas nessas lesões. Embora o reagente utilizado para imunohistoquímica tenha sido o mesmo, em nosso trabalho foi quantificado o número de fibras nervosas por campo de grande aumento, enquanto Tokushigue *et al.* (2009) avaliaram a densidade de fibras por mm<sup>2</sup>.

No entanto, ao fazer uma segunda análise, e comparar as fibras nervosas dos implantes de diferentes topografias de uma mesma paciente, identificamos que no grupo sem o tratamento hormonal, as lesões dos ligamentos útero-sacros

apresentavam um número significativamente maior de fibras nervosas. Desse modo, pode-se inferir uma interferência do tratamento hormonal nas fibras nervosas, reduzindo-as, principalmente no sítio onde a presença e expressão de fibras nervosas é maior. Tal fato também foi identificado ao comparar as fibras nervosas nos implantes das fossas ovarianas com os ovários – nas quais o tratamento hormonal mostrou uma redução significativa nas fibras nervosas quando comparado ao grupo sem tratamento hormonal. Desse modo, o efeito do tratamento hormonal parece estar diretamente relacionado à quantidade de fibras nervosas nos implantes (nos ovários, a presença de fibras nervosas é pequena) – quanto mais fibras nervosas em determinada topografia, maior a possibilidade do tratamento hormonal reduzir essas fibras nervosas.

Com relação aos receptores hormonais, o tratamento clínico com progestágenos isolados ou anticoncepcionais orais combinados não influenciou na expressão dos receptores nas diversas topografias de endometriose avaliadas. Entretanto, ao avaliar a expressão dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona em cada lesão, observou-se uma expressão bem maior dos receptores hormonais de progesterona em todas as topografias analisadas, quando comparado à expressão dos receptores de estrogênio. O predomínio dos receptores hormonais de progesterona foi estatisticamente superior em todas as topografias: fossa ovariana (FO), fundo de saco anterior (FSA), fundo de saco posterior (FSP), ligamento útero-sacro (LUS) e Ovários. Desse modo, nota-se algo interessante, uma vez que a endometriose é sabidamente uma doença estrogênio dependente. Bulun *et al.*, 2012 já demonstraram que implantes peritoneais de endometriose exibem expressão dos RE $\beta$  superior quando comparados as células endometriais normais. Os achados encontrados em nosso trabalho podem indicar um papel mais relevante da progesterona e dos receptores de progesterona - tanto no estabelecimento da patologia quanto na manutenção da doença e, conseqüentemente, no direcionamento do tratamento clínico, corroborando a importância dos progestágenos nas suas diferentes apresentações no alívio da dor crônica dessas pacientes. Estudos futuros devem ser encorajador para elucidar melhor a real contribuição dos receptores de progesterona na gênese e fisiopatologia da endometriose.

Na literatura atual, poucos trabalhos avaliando receptores hormonais em focos de endometriose foram encontrados. Desses trabalhos, nenhum avaliou

relação dos receptores E/P (Estrogênio/Progesterona) e a influência do tratamento hormonal nesses implantes, o que torna esse trabalho pioneiro nesse sentido. Com o resultado, identificamos que a progesterona e, principalmente os receptores hormonais de progesterona, podem ter um papel mais relevante na fisiopatologia da endometriose do que creditado até o momento.

O uso de moduladores dos receptores de progesterona no tratamento de patologias ginecológicas uterinas – como miomatose uterina e endometriose, já foi descrito. Os benefícios dessa medicação na endometriose estariam vinculados ao potencial antiproliferativo que esses compostos apresentam, bem como a indução da apoptose, levando a redução dos focos de endometriose. Esses mesmos efeitos também estariam associados a diminuição do volume dos miomas uterinos. No entanto, devido à possíveis efeitos colaterais indesejáveis, e, principalmente pelo fato de estarem pouco disponíveis em nosso meio (a grande maioria dessas medicações tem efeito abortivo e não são liberadas pela ANVISA) – fatores que limitariam o seu uso, poucos estudos na endometriose estão disponíveis nessa classe de medicamentos. No entanto, em recente estudo realizado por Song *et al.*, 2018, demonstraram que comparado à gestrinoma, os efeitos colaterais do mifepristone foi inferior ao grupo tratado com gestrinoma.

Os resultados obtidos em nosso trabalho justificam a retomada de estudos direcionados a essa classe medicação na endometriose, possibilitando novas perspectivas para o seu tratamento e, conseqüentemente, melhora da qualidade de vida das pacientes acometidas por essa patologia.

Outro fato importante a ser considerado persiste na escolha do tratamento hormonal na endometriose. Embora os anticoncepcionais orais combinados sejam amplamente utilizados e apresentem boa resposta à dor em algumas pacientes – principalmente devido a amenorréia, algumas pacientes apresentam resistência a progesterona. Diversos autores descrevem que a presença do estrogênio nessas combinações favoreceria à estimulação dos implantes de endometriose, o que facilitaria o desenvolvimento da resistência a progesterona em alguns casos. Além disso, estudos mais recentes confirmam uma melhor resposta à dor quando as pacientes são tratadas com progestágenos isolados, sendo a maior parte desses estudos realizados com dienogeste. Desse modo, e com os achados desse trabalho, cada paciente deve ter seu tratamento individualizado e, quando possível, avaliar a resposta ao tratamento com progestágenos isolados inicialmente.



Nosso estudo tem suas limitações. Por se tratar de um estudo com coleta de dados histórico, nem todas as pacientes apresentavam as lesões em todas as topografias analisadas, fazendo com que algumas lesões não fossem passíveis de comparação, o que pode ter um viés de interpretação na análise de algumas localizações devido ao limitado número e variabilidade da amostra em alguns sítios específicos. Outro ponto a ser considerado, é a limitação de mais dados clínicos – não foi possível avaliar a intensidade da dor dessas pacientes previamente para uma comparação mais acurada entre a clínica de dor e a presença de fibras nervosas. Embora o patologista que analisou as amostras tenha grande experiência em endometriose, a análise das lâminas não foi revisada por outro patologista.

Os resultados obtidos com esse estudo confirmam a presença de fibras nervosas em implantes de endometriose e uma possível colaboração desses na gênese da dor e mostram que o tratamento hormonal pode reduzir a quantidade de fibras nervosas em implantes de endometriose. Além disso, demonstrou-se a maior expressão de receptores hormonais de progesterona nos focos de endometriose quando comparados aos receptores de estrogênio nas mesmas topografias, o que pode direcionar para um novo caminho e novas perspectivas de estudos para o tratamento da endometriose com o objetivo de melhora da qualidade de vida dessas pacientes. Novos estudos devem ser estimulados utilizando moduladores de receptores de progesterona na endometriose para avaliar seus possíveis benefícios.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que as fibras nervosas estão presentes nos implantes de endometriose das fossas ovarianas, fundo de saco anterior e posterior, ligamentos útero-sacros e também no ovário.

Os ligamentos útero-sacros foram os locais com maior número de filetes nervosos e o tratamento hormonal reduziu a quantidade de fibras nervosas nesse local.

Os receptores hormonais de estrogênio e progesterona são encontrados nos implantes de endometriose das fossas ovarianas, fundo de saco anterior e posterior, ligamentos útero-sacros e no ovário. Os dados analisados indicam que os receptores de progesterona são predominantes nesses implantes.

O tratamento hormonal não influenciou a expressão dos receptores hormonais nas topografias avaliadas.

## REFERÊNCIAS

- AGHAEY MEIBODY, F.; *et al.* Diagnosis of endometrial nerve fibers in women with endometriosis. **Archives of Gynecology and Obstetrics**. v. 284, n. 5, p. 1157-62, nov, 2011.
- AL-FOZAN, H.; *et al.* Nerve fibers in ovarian dermoid cysts and endometriomas. **Fertility and Sterility**. v. 82, n. 1, p. 230–231, jul, 2004.
- ANAF, V.; *et al.* Relationship between endometriotic foci and nerves in rectovaginal endometriotic nodules. **Human Reproduction**. v. 15, n 8, p. 1744–1750, ago, 2000.
- ARNOLD, J.; *et al.* Neuroimmunomodulatory alterations in non-lesional peritoneum close to peritoneal endometriosis. **Neuroimmunomodulation**. v. 20. n 1, p. 9-18, nov, 2014.
- ASANTE, A.; TAYLOR, R. N. Endometriosis: the role of neuroangiogenesis. **Annual Review og Physiology**.v. 73, p. 163–82, mar, 2011.
- BARCENA DE ARELLANO, M. L.; *et al.* Overexpression of nerve growth factor in peritoneal fluid from women with endometriosis may promote neurite outgrowth in endometriotic lesions. **Fertility and Sterility**. v. 95, n. 3, p. 1123–1126, mar, 2011.
- BERKLEY, K. J.; RAPKIN, A. J.; PAPKA, R. E. The pains of endometriosis. **Science**. v. 308, n. 5728, p. 1587-1589, jun, 2005.
- BULUN, S. E.; *et al.* Role of estrogen receptor- $\beta$  in endometriosis. **Seminars in Reproductive Medicine**. v. 30, p.39–45, jan, 2012.
- BURNEY, R.O.; GIUDICE, L.C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. **Fertility and Sterility**. v. 98, n.3, p. 511-519, set, 2012.
- CHEN, Y.; *et al.* Effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation on nerve fibers of a rat model of endometriosis. **International Journal of Fertility and Sterilit**. v. 9, n. 1, p. 71–81, abr, 2015.
- ELLETT, L.; *et al.* Are endometrial nerve fibres unique to endometriosis? A prospective case-control study of endometrial biopsy as a diagnostic test for endometriosis in women with pelvic pain. **Human Reproduction**. v. 30, n. 12, p. 2808–2815, dez, 2015.

FAUCONNIER, A.; CHAPRON, C. Endometriosis and pelvic pain: epidemiological evidence of the relationship and implications. **Human Reproduction**. v. 11, n. 6, p. 595-606, nov-dez, 2005.

FERRERO, S.; *et al.* Loss of sympathetic nerve fibers in intestinal endometriosis. **Fertility and Sterility**. v. 94, p. 2817–9, dez, 2010.

FIGUEIREDO, F. A. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Endometriose. 2016, disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/agosto/02/Portaria-SAS-879-PCDT-Endometriose-12-07-2016-ATUALIZA----O.pdf>

FRASER, I. S. Mysteries of endometriosis pain: Chien-Tien Hsu Memorial Lecture 2009. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**. v. 36, n. 1, p. 1–10, fev, 2010.

GRANDI, G.; *et al.* Inflammation influences steroid hormone receptors targeted by progestins in endometrial stromal cells from women with endometriosis. **Journal of Reproductive Immunology**. v. 117, p. 30-8, set, 2006.

GREAVES, E.; *et al.* Estradiol Is a Critical Mediator of Macrophage-Nerve Cross Talk in Peritoneal Endometriosis. **American Journal of Pathology**. v. 185, n. 8, p. 2286–2297, ago, 2015.

GUO, R.; *et al.* Associations between estrogen receptor-beta polymorphisms and endometriosis risk: a meta-analysis. **Diagnostic Pathology**. v. 184, set, 2014.

HAN, S. J.; *et al.* Estrogen receptor  $\beta$  modulates apoptosis complexes and the inflammasome to drive the pathogenesis of endometriosis. **Cell**. v. 163, p.960–974, nov, 2015.

HUNTER, C.W.; *et al.* Anatomy, pathophysiology and interventional therapies for chronic pelvic pain: A review. **Pain Physician**. v. 21, p.147–167, mar, 2018.

KELM, A. R.; *et al.* Nerve fibers in uterosacral ligaments of women with deep infiltrating endometriosis. **Journal of Reproductive Immunology**. v. 79, n. 1, p. 93–99, out, 2008.

KOBAYASHI, H.; *et al.* Mechanism of pain generation for endometriosis-associated pelvic pain. **Archives of Gynecology and Obstetrics**. v. 289, n. 1, p. 13–21, jan, 2014.

KOGAN, E. A.; *et al.* The morphological substrate and pathogenetic mechanisms of pelvic pain syndrome in endometriosis. **Akademiia meditsinskikh nauk**. v. 76, n. 6, p. 37–43, mai-jun, 2016.

KYAMA, C.M.; *et al.* Increased peritoneal and endometrial gene expression of biologically relevant cytokines and growth factors during the menstrual phase in women with endometriosis. **Fertility and Sterility**. v, 85, p. 1667–75, jun, 2006.

KYAMA, C.M.; *et al.* Role of cytokines in the endometrial-peritoneal cross-talk and development of endometriosis. **Frontiers in Bioscience**. v. 1, p. 444–54, jun, 2009.

LEONELLI, E.; *et al.* Neuroactive steroids: A therapeutic approach to maintain peripheral nerve integrity during neurodegenerative events. **Journal of Molecular Neuroscience**. v. 28, n. 1, p. 65-76, fev, 2006.

MCKINNON, B. D.; *et al.* Inflammation and nerve fiber interaction in endometriotic pain. **Trends in Endocrinology & Metabolism**. v. 26. p. 1-10, jan, 2015.

MECHSNER, S.; *et al.* A pilot study to evaluate the clinical relevance of endometriosis-associated nerve fibers in peritoneal endometriotic lesions. **Fertility and Sterility**. v. 92, n. 6, p. 1856-1861, dez, 2009.

MEDINA, M. G.; LEBOVIC, D. I. Endometriosis-associated nerve fibers and pain. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**. v. 88, n. 9, p. 968–75, ago, 2015.

MEHEDINTU, C., *et al.* Endometriosis still a challenge. **Journal of Medicine and Life**. v. 7, n. 3, p. 349–357, set, 2014.

MILLER, E. J.; FRASER, I. S. The importance of pelvic nerve fibers in endometriosis. **Women's Health**. v. 11, n. 5, p. 611–618, ago, 2015.

MIRKIN, D., MURPHY-BARRON, C.; IWASAKI, K. Actuarial analysis of private payer administrative claims data for women with endometriosis. **Journal of Managed Care and Specialty Pharmacy**. v.13, p. 262–272, abr, 2007.

MOROTTI, M.; VINCENT, K.; BECKER, C. M. Mechanisms of pain in endometriosis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. v. 209, p. 8-13, fev 2017.

MUNEYYIRCI-DELALE, O.; KARACAN, M. Effect of norethindrone acetate in the treatment of symptomatic endometriosis. **International Journal Fertil Womens**. v. 43, n. 1, p. 24–7, jan-fev, 1998.

NNOAHAM, K.E. *et al.* Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. **Fertility and Sterility**. v. 96, p. 366–373, ago, 2011.

NOVELLA-MAESTRE, E.; *et al.* Effect of antiangiogenic treatment on peritoneal endometriosis-associated nerve fibers. **Fertility and Sterility**. v. 98, n. 5, p. 1209–1217, nov, 2012.

PARAZZINI, F.; *et al.* Estroprogestin vs. gonadotrophin agonists plus estroprogestin in the treatment of endometriosis-related pelvic pain: a randomized trial. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. v. 88, p. 11–4, jan, 2000.

RAMANAH, R. Anatomical and histological study of the uterosacral ligament: practical surgical consequences. **Journal de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de La Reproduction**. v. 38, n. 4, p. 304-11, jun, 2009.

ROCHA, M.G.; *et al.* TRPV1 expression on peritoneal endometriosis foci is associated with chronic pelvic pain. **Reproductive Sciences**. v. 18, p.511–5, dez, 2010.

SCHEERER, C.; *et al.* Reduced Sympathetic Innervation in Endometriosis is Associated to Semaphorin 3C and 3F Expression. **Molecular Neurobiology**. v. 54, n. 7, p. 5131-5141, set, 2017.

SIMMEN, R.C.; KELLEY, A.S. Reversal of fortune: estrogen receptor- $\beta$  in endometriosis. **Journal of Molecular Endocrinology**. v. 57, n. 2, p. 23-7, ago, 2016.

SIMOENS, S.; *et al.* The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. **Human Reproduction**. v. 27, p. 1292–1299, mai, 2012.

SMITH, P. G.; GEORGE, M.; BRADSHAW, S. Estrogen promotes sympathetic nerve regeneration in rat proximal urethra. **Urology**. v. 73, n. 6, p.1392-6, jun, 2009.

SONG, J.; WANG, Y.; Yu, L. Clinical comparison of mifepristone and gestrinome for laparoscopic endometriosis. **Pakistan Journal of pharmaceutical sciences**. v. 5, p. 2197-2201.

STRATTON, P.; BERKLEY, K. J. Chronic pelvic pain and endometriosis: translational evidence of the relationship and implications. **Human Reproduction Update**. v. 17, n. 3, p. 327–346, mai-jun, 2011.

SUTTON, C.; JONES, K.; ADAMSON, G. D. **Modern Management of Endometriosis**. v. 1, Boca Raton: Editora CRC Press, nov, 2005.

TARJANNE, S.; *et al.* Use of hormonal therapy is associated with reduced nerve fiber density in deep infiltrating, rectovaginal endometriosis. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**. v. 94, n. 7, p. 693-700, jul, 2015.

TOKUSHIGE, N.; *et al.* Nerve fibers in peritoneal endometriosis. **Human Reproduction**. v. 21, n. 11, p. 3001–3007, nov, 2006.

TOKUSHIGE, N.; *et al.* Different types of small nerve fibers in eutopic endometrium and myometrium in women with endometriosis. **Fertility and Sterility**. v. 88, n. 4, p. 795-803, out, 2007.

TOKUSHIGE, N.; *et al.* Effect of progestogens and combined oral contraceptives on nerve fibers in peritoneal endometriosis. **Fertility and Sterility**. v. 92, n. 4, p. 1234-9, out, 2009.

TOKUSHIGE, N.; *et al.* Nerve fibers in ovarian endometriomas. **Fertility and Sterility**. v. 94, n. 5, p. 1944–1947, out, 2010.

VERCELLINI, P.; *et al.* Endometriosis: pathogenesis and treatment. **Nature Reviews Endocrinology**. v. 10, n. 5, p. 261–275, dez, 2013.

ZHANG, X.; *et al.* Endometrial nerve fibers in women with endometriosis, adenomyosis, and uterine fibroids. **Fertility and Sterility**. v. 92, n. 5, p. 1799–1801, nov, 2009.

ZHANG, X. *et al.* Nerve fibres in ovarian endometriotic lesions in women with ovarian endometriosis. **Human Reproduction**. v. 25, n. 2, p. 392–397, out, 2010.

WANG, G.; *et al.* Rich innervation of deep infiltrating endometriosis. **Human Reproduction**. v. 24, p. 827–34, abril, 2009.



## ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Distribuição de Fibras Nervosas e Receptores Hormonais em diferentes lesões de Endometriose

**Pesquisador:** Jaime Kulak Junior

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 72989717.4.0000.0102

**Instituição Proponente:** Departamento de Tocoginecologia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.313.645

#### Apresentação do Projeto:

Projeto oriundo do programa e pós-graduação do Departamento de Tocoginecologia, intitulado Distribuição de Fibras Nervosas e Receptores Hormonais em diferentes lesões de Endometriose, sob a responsabilidade do Professor Dr. Jaime Kulak, tendo como colaboradores Professora Dra. Tereza Cristina Santos Cavalcanti (co-orientadora) e o mestrando Luis Rodrigo Guimarães Ferreira.

#### Objetivo da Pesquisa:

Esse trabalho tem como objetivo investigar a distribuição das fibras nervosas em lesões de endometriose, possíveis efeitos do tratamento hormonal nessas lesões, assim como avaliar a presença de receptores hormonais nessas lesões, com o intuito de possibilitar novas abordagens terapêuticas e aprimorar o tratamento da endometriose.

1.1 Objetivo geral: identificar o tamanho e a distribuição das fibras nervosas em diferentes lesões de endometriose;

1.2 Objetivos específicos:

- a) avaliar a presença de receptores de estrogênio e progesterona nas lesões de endometriose;
- b) avaliar se há influência do tratamento hormonal no diâmetro das fibras nervosas das lesões de endometriose

**Endereço:** Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

**Bairro:** Alto da Glória

**CEP:** 80.060-240

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-7259

**E-mail:** cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.313.645

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Como benefícios os autores informam " Com melhor conhecimento da endometriose e da fisiopatologia da dor relacionada a ela, pode-se aventar novas abordagens terapêuticas e possivelmente identificar grupos de pacientes que se beneficiariam mais ou menos com o tratamento hormonal, visando conquistar maior qualidade de vida pra essa pacientes. Desse modo, melhorando a qualidade de vida das pacientes, significa que também teremos chance de maior produtividade do trabalho o que favorece toda a sociedade".

Como riscos: "Trata-se de um estudo retrospectivo e o principal risco inerente a pesquisa é a quebra da confidencialidade. Será assegurado todos os esforços para que isso não ocorra – somente o pesquisador ira ter acesso aos dados do prontuário e após a seleção dos dados e peças cirúrgicas , serão identificados por números e/ou letras".

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Os autores justificam seu estudo por considerando a endometriose uma patologia complexa e que pode trazer grande prejuízo na qualidade das pacientes e traumas pessoais às pacientes– como dor crônica e infertilidade.

Os pesquisadores justificam a dispensa do TCLE informando que as pacientes neste serviço já assinam um TCLE ( assistencial).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos obrigatórios foram anexados.

O TCLE, assistencial, modelo utilizado no serviço,foi anexado no projeto, como Anexo I.

**Recomendações:**

Recomenda-se uma revisão gramatical do texto

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Atendidas as pendências

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo:

**Endereço:** Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

**Bairro:** Alto da Glória

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**CEP:** 80.060-240

**Telefone:** (41)3360-7259

**E-mail:** cometica.saude@ufpr.br

**UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -**



Continuação do Parecer: 2.313.645

NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Emenda – ver modelo de carta em nossa página: [www.cometica.ufpr.br](http://www.cometica.ufpr.br) (obrigatório envio)

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa_detalhado_02_10_17_1.docx	03/10/2017 15:38:25	IDA CRISTINA GUBERT	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_830313.pdf	30/09/2017 11:11:20		Aceito
Outros	Carta_CEP.docx	30/09/2017 11:10:56	Luiz Rodrigo Guimaraes Ferreira	Aceito
Outros	Projeto_de_pesquisa_detalhado_corrigido.docx	30/09/2017 11:09:32	Luiz Rodrigo Guimaraes Ferreira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoDeCompromissoUtilizacaoDadosDeArquivo.pdf	01/09/2017 12:55:50	Luiz Rodrigo Guimaraes Ferreira	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAgosto.pdf	30/08/2017 15:41:25	Luiz Rodrigo Guimaraes Ferreira	Aceito
Outros	TermoCompromissoInicioPesquisa.pdf	06/08/2017 20:19:27	Luiz Rodrigo Guimaraes Ferreira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ATA.pdf	04/08/2017 09:32:51	Luiz Rodrigo Guimaraes Ferreira	Aceito
Outros	DeclaracaoDeResponsabilidades.pdf	03/08/2017 22:28:32	Luiz Rodrigo Guimaraes Ferreira	Aceito
Outros	DeclaracaoDeTornarPublicoOsResultados.pdf	03/08/2017 22:27:41	Luiz Rodrigo Guimaraes Ferreira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DispensaDoTermoDeConsentimento.pdf	03/08/2017 22:24:16	Luiz Rodrigo Guimaraes Ferreira	Aceito
Outros	OficioAoCEP.pdf	03/08/2017 22:23:35	Luiz Rodrigo Guimaraes Ferreira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa_detalhado.docx	21/07/2017 16:16:24	Luiz Rodrigo Guimaraes Ferreira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Confidencialidade.pdf	21/07/2017 16:14:43	Luiz Rodrigo Guimaraes Ferreira	Aceito
Declaração de	Declaracao_de_udo_especifico_de_m	21/07/2017	Luiz Rodrigo	Aceito

**Endereço:** Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

**Bairro:** Alto da Glória

**CEP:** 80.060-240

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-7259

**E-mail:** [cometica.saude@ufpr.br](mailto:cometica.saude@ufpr.br)

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.313.645

Pesquisadores	arterial_e_dados_coletados.pdf	16:14:17	Guimaraes Ferreira	Aceito
Outros	Analise_de_Merito.pdf	21/07/2017 16:13:41	Luiz Rodrigo Guimaraes Ferreira	Aceito
Outros	Notificaaopesquisador.pdf	18/07/2017 16:19:21	Gilse Elisangela da Silva de Souza	Aceito
Outros	SolicitacaoPesquisadorresponsavel.pdf	18/07/2017 16:19:21	Gilse Elisangela da Silva de Souza	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Solicitacao_para_alterar_pesquisador_r esponsavel.pdf	18/07/2017 16:10:59	Luiz Rodrigo Guimaraes Ferreira	Aceito
Outros	Check_list.pdf	18/07/2017 10:19:35	Luiz Rodrigo Guimaraes Ferreira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Instituicao_Coparticipante.pdf	18/07/2017 10:12:00	Luiz Rodrigo Guimaraes Ferreira	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

CURITIBA, 04 de Outubro de 2017

---

**Assinado por:**  
**IDA CRISTINA GUBERT**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

**Bairro:** Alto da Glória

**UF:** PR **Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-7259

**CEP:** 80.060-240

**E-mail:** cometica.saude@ufpr.br

**ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu, ....., portadora do RG ....., declaro que concordo em disponibilizar os dados referentes à minha doença e o vídeo da minha cirurgia para eventuais PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS e APRESENTAÇÕES EM CURSOS E CONGRESSOS.

Estou ciente de que nunca terei meu nome divulgado, que os resultados são confidenciais e que serão utilizados unicamente para fins de ensino e pesquisa. Autorizo a divulgação dos resultados e da evolução clínica das análises realizadas. Sei que tenho liberdade de recusar a disponibilização desses dados sem que isso traga nenhum prejuízo ao meu tratamento.

---

Assinatura da paciente

---

/ /

### **ANEXO 3 – TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA**

O material é incluído em parafina e são realizados cortes de 4 micrômetros sobre lâminas silanizadas. A seguir, os cortes são submetidos à desparafinização, hidratação e recuperação antigênica em tampão citrato (Ph 6.0) por 20 minutos. Após banho em tampão fosfato, é realizado o bloqueio da peroxidase endógena mergulhando-se as lâminas em peróxido de hidrogênio a 3% em água destilada durante 5 minutos (2 banhos). Em seguida os cortes são incubados com o anticorpo adequado ao estudo na diluição correspondente, permanecendo overnight em geladeira à temperatura média de 4°C. Após banho em tampão fosfato, os cortes são incubados com o Advance HRP Link por 30 minutos em temperatura ambiente. Novo banho em tampão fosfato e os cortes são incubados no Advance HRP Enzyme também em temperatura ambiente por 30 minutos. A marcação é revelada com o cromógeno diaminobenzidina, dando uma coloração marrom à marcação positiva dos citados anticorpos. As lâminas são então contra-coradas com hematoxilina e cobertas com lamínulas de vidro utilizando-se bálsamo do Canadá.