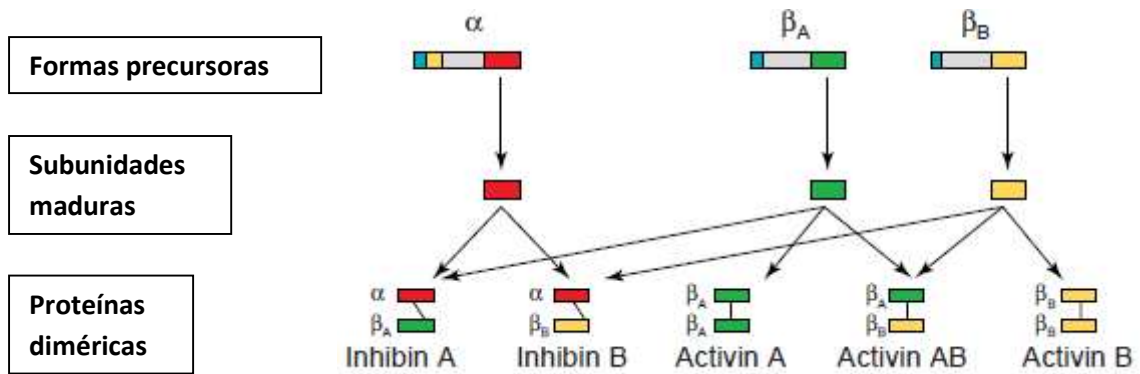


## I - INTRODUÇÃO

### 1- Ativinas

As ativinas são fatores de crescimento relacionados a uma série de processos biológicos, podendo ser encontradas em diversos tecidos. Sua descoberta ocorreu a partir do isolamento das subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ A e  $\beta$ B no fluido folicular ovariano. Inicialmente, foram identificadas proteínas heterodiméricas, formadas por uma subunidade  $\alpha$  e uma  $\beta$ , tendo sido denominadas inibinas, devido à sua capacidade de inibir a secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) pela hipófise anterior. Subsequentemente, também em âmbito gonadal, foi possível a demonstração das ativinas, proteínas homodiméricas compostas de duas subunidades  $\beta$ . Desta maneira, em um primeiro momento, foram evidenciados cinco tipos de proteínas diméricas, conforme a junção das três subunidades descritas: inibina A ( $\alpha\beta$ A), inibina B ( $\alpha\beta$ B), ativina A ( $\beta$ A $\beta$ A), ativina B ( $\beta$ B $\beta$ B), ativina AB ( $\beta$ A $\beta$ B) (Ling *et al.*, 1986; Vale *et al.*, 1986; Vale e Bilezikjian, 1992; Chen *et al.*, 2006) (Figura 1).



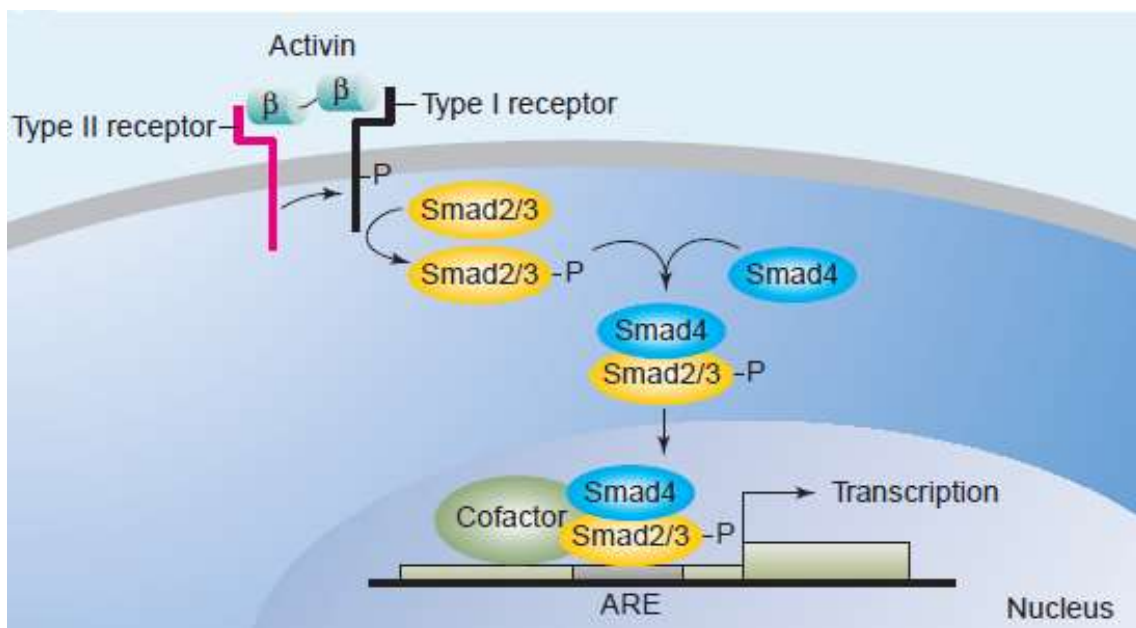
**Figura 1:** Representação esquemática da composição das ativinas e inibinas. Proteínas monoméricas, em suas formas precursoras, dão origem às subunidades  $\alpha$ ,  $\beta_A$  e  $\beta_B$ , cuja dimerização resulta na formação das ativinas e inibinas (Fonte: Adaptado de Ethier JF, Findlay JK. Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. *Reproduction* 2001;121:667-675.)

Estudos posteriores reconheceram a codificação gênica de outras duas subunidades  $\beta$  em humanos ( $\beta_C$  e  $\beta_E$ ) e, conseqüentemente, foram demonstrados outros tipos de ativina. No entanto, sua função e estabilidade *in vivo* ainda estão pouco elucidadas (Chen, 2006 *et al.*; Kaitu'u-Lino *et al.*, 2009).

Devido à semelhança estrutural com o fator de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta$ ), as ativinas são classificadas como membros da superfamília TGF- $\beta$ , grupo composto por pelo menos 42 moléculas, relacionadas a vários processos essenciais de proliferação, diferenciação, apoptose e remodelamento tissular (Chen *et al*, 2006; Jones *et al.*, 2006).

De forma análoga às outras proteínas pertencentes à família TGF- $\beta$ , as ativinas interagem com um complexo de receptores enzimáticos de superfície celular transmembrana, com atividade serina/treonina cinase em seus domínios citoplasmáticos. São eles: receptores tipo I e tipo II.

Primeiramente, a ativina liga-se ao domínio extracelular do receptor tipo II (ActRIIB), desencadeando o recrutamento, fosforilação e ativação do receptor tipo I (ActRIB, também chamado ALK4). Este, por sua vez, irá ativar a sinalização via Smads, um conjunto de proteínas relacionadas à transdução de sinal dos ligantes pertencentes à família TGF- $\beta$ . No caso da ativina, estão envolvidas, especificamente, as Smads 2 e 3 que, após serem ativadas por fosforilação, se associam à Smad 4 e o complexo formado migra até o núcleo onde promoverá a expressão de genes alvo (Chen *et al.*, 2006; Kaitu'u-Lino *et al.*, 2009) (Figura 2).



**Figura 2:** Representação esquemática do mecanismo de sinalização das ativinas via Smads (Fonte: Ethier JF, Findlay JK. Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. *Reproduction* 2001;121:667-675.)

De modo a extrapolar os achados iniciais, diversos trabalhos têm demonstrado a presença e a ação biológica das ativinas em ambiente extragonadal. Tais fatores de crescimento atuam como moduladores autócrinos

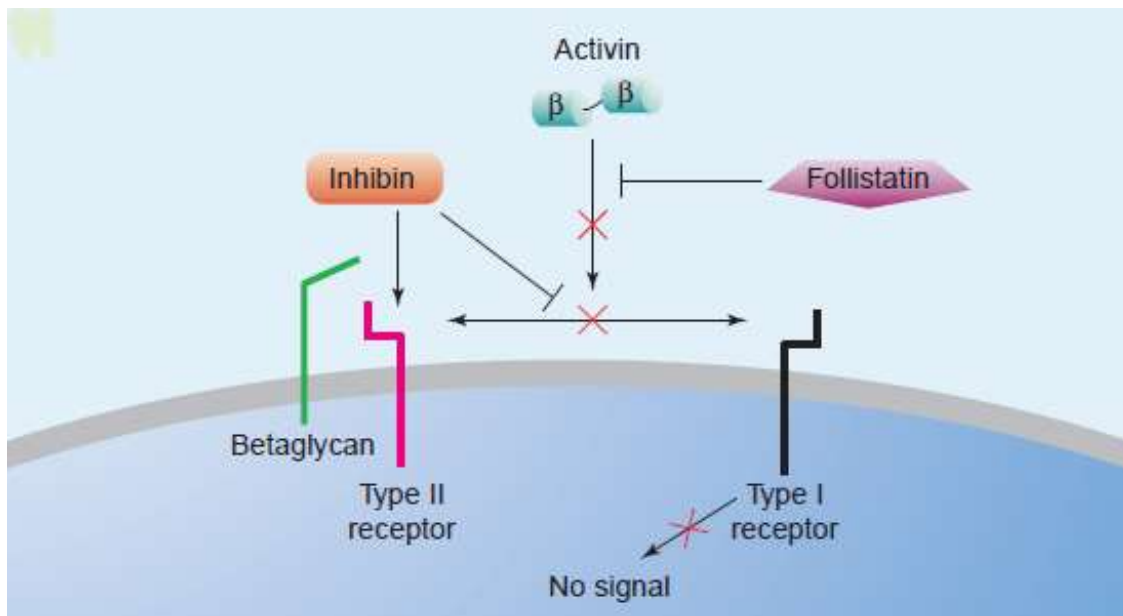
e/ou parácrinos em uma gama de células e tecidos, com atividades fisiológicas relacionadas à diferenciação e proliferação celulares, metabolismo, resposta imune, função endócrina e apoptose (Chen *et al.*, 2006). Fortes evidências mostram ainda que as ativinas atuam como importantes reguladores de processos reprodutivos (Ethier e Findlay, 2001). A ativina A, especificamente, já foi identificada no endométrio de mulheres saudáveis e no de pacientes com endometriose, apresentando um papel chave em processos endometriais fisiológicos e, possivelmente, em alguns patológicos (Reis *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2011).

## **2- Folistatina**

A folistatina é um polipeptídeo monomérico rico em cisteína capaz de ligar-se com alta afinidade à ativina. No organismo, a folistatina se apresenta em duas formas principais, uma isoforma longa (FS315), composta por 315 aminoácidos, e outra curta, com 288 aminoácidos (FS288). De modo semelhante à ativina, sua primeira identificação ocorreu no líquido folicular, mas estudos já comprovaram sua produção em diversas outras localidades, como na hipófise, na placenta e no endométrio (Torres *et al.*, 2007). A produção de folistatina também foi demonstrada em tecidos endometrióticos. Florio *et al.* observaram aumento dos níveis séricos de folistatina em mulheres com endometriose, tornando possível a diferenciação entre endometriomas e outros cistos benignos de ovário. A partir deste estudo, os autores sugeriram, ainda, um possível papel da folistatina como marcador clínico da endometriose ovariana em estágio avançado (Florio *et al.*, 2009).

Embora existam outras proteínas ligadoras de ativina com potencial de inibição de sua bioatividade (ex: inibinas), a folistatina tem sido considerada por muitos autores como seu principal antagonista, principalmente no caso da ativina A, cuja afinidade pela folistatina chega a ser 10 vezes maior, quando comparada à ativina B (Chen *et al.*, 2006).

Enquanto a inibina age ligando-se a um correceptor (ex.: betaglicano), formando um complexo que bloqueará a união da ativina com o receptor tipo II, a folistatina atua através de uma ligação direta à ativina, promovendo um bloqueio quase irreversível da interação ativina-ActRII (Nakamura *et al.*, 1990; Ferreira *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2012; Refaat, 2014) (Figura 3).



**Figura 3:** Representação esquemática dos mecanismos de ação dos antagonistas da ativina: folistatina e inibina (Fonte: Ethier JF, Findlay JK. Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. *Reproduction* 2001;121:667-675.)

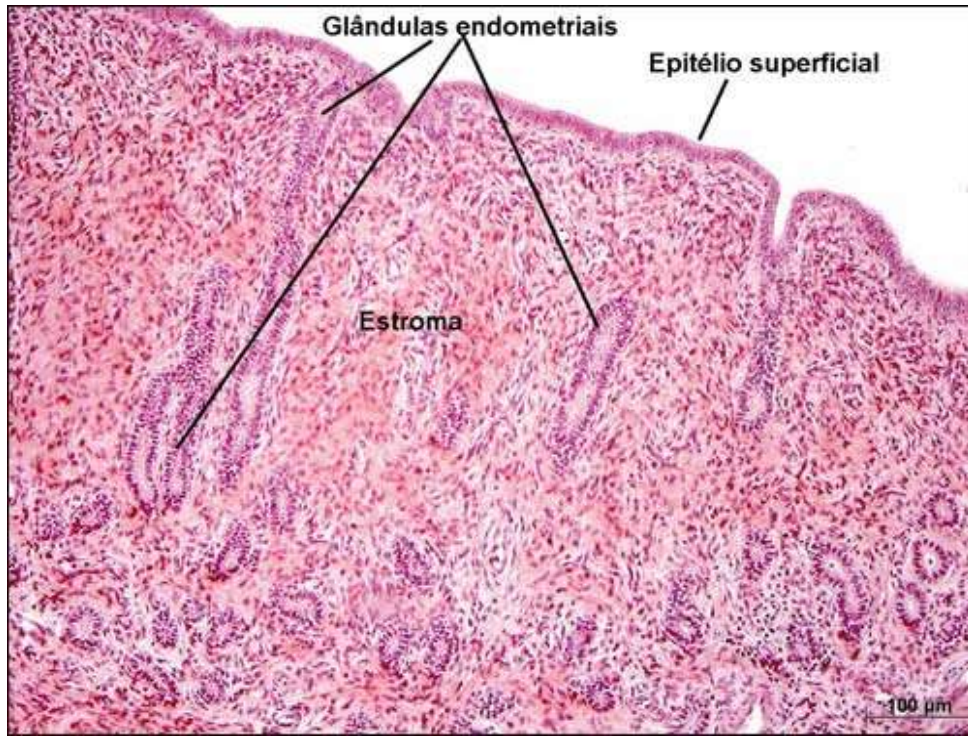
No endométrio, ao antagonizar a ativina A, a folistatina foi demonstrada como sendo capaz de inibir a decidualização *in vitro* (Jones *et al.*, 2002a). Também tem sido aventada a possibilidade de que níveis elevados da folistatina possam exercer um papel prejudicial na receptividade endometrial (Florio *et al.*, 2009).

### **3. Ativina A e endométrio**

#### **3.1- Características morfológicas e funcionais do endométrio humano**

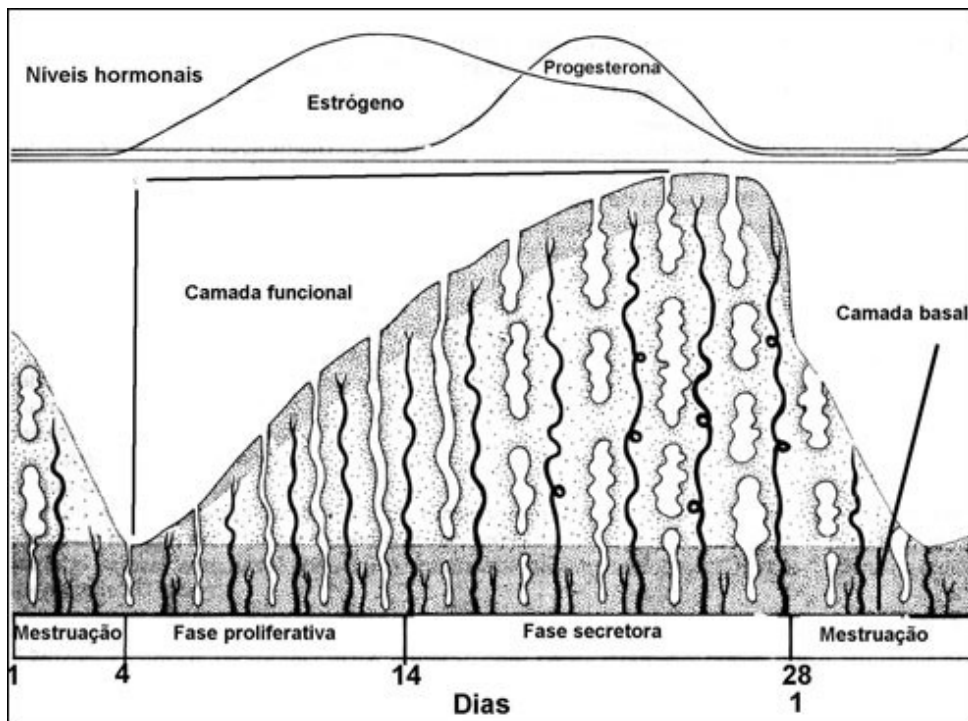
Antes de descrever as relações entre a ativina A e as células endometriais, é de grande valia a realização de uma breve revisão acerca das características e peculiaridades do endométrio humano.

O endométrio constitui a membrana mucosa de revestimento da cavidade uterina, composta basicamente por células epiteliais cilíndricas simples, glândulas tubulares simples, vasos sanguíneos e estroma (Figura 4). As células estromais formam o tecido de sustentação das glândulas endometriais e compreendem os fibroblastos, alguns macrófagos, linfócitos T e poucos linfócitos B. Classicamente, o endométrio pode ser dividido em duas camadas: basal, onde se situam as bases das glândulas e as células responsáveis pela regeneração endometrial; e funcional, região que, sob o comando dos hormônios sexuais ovarianos, sofre alterações cíclicas a cada mês (Kelly *et al.*, 2001) (Figura 5).



**Figura 4:** Corte histológico do endométrio.

(Fonte: <http://www2.unifesp.br/dmorfo/histologia/ensino/utero/histologia.htm>).



**Figura 5:** Representação esquemática das alterações endometriais, regidas pelos hormônios sexuais ovarianos, ao longo do ciclo menstrual.

(Fonte: <http://www2.unifesp.br/dmorfo/histologia/ensino/fFutero/histologia.htm>).

O endométrio é responsável por prover, a cada ciclo menstrual, um período hormônio-dependente, chamado janela de implantação, no qual se instala dentro do útero um ambiente ótimo para o recebimento do embrião. Caracteriza-se, ainda, pela capacidade de se renovar, caso não ocorra a gravidez, além de atuar como uma superfície de proteção contra a invasão intrauterina de patógenos (Kelly *et al.*, 2001).

Na primeira fase do ciclo menstrual, também chamada proliferativa, o endométrio menstrual, cujo estrato funcional sofreu descamação e ruptura de vasos sanguíneos, inicia, sob a regência do estrogênio, uma etapa de reconstrução. Esta fase é caracterizada por grande proliferação celular que ocorre tanto no compartimento epitelial/glandular como no estromal (von Rango *et al.*, 1998).

Após a ovulação, a progesterona produzida pelo corpo lúteo passa a dominar o ambiente uterino. A esta fase do ciclo menstrual, dá-se o nome de secretora, termo que remete às alterações das glândulas que se tornam tortuosas e dilatadas devido à secreção de grande quantidade de mucopolissacarídeos. A partir do meio da fase secretora, ainda sob altas concentrações de progesterona e sob o efeito de uma combinação de outros agentes, origina-se no endométrio o fenômeno de decidualização. As células estromais sofrem uma mudança morfológica e funcional, também denominada remodelamento endometrial, e passam a ter um aspecto arredondado, semelhante a fibroblastos, com produção de prolactina. O processo se inicia nas células próximas às arteríolas espirais e, gradualmente, se espalha através

do endométrio, tornando-se particularmente mais evidente quando ocorre a gravidez (Kelly *et al.*, 2001).

A decidualização tem por objetivo primordial o preparo do endométrio, visando tornar o ambiente intrauterino mais apto à implantação embrionária e à invasão trofoblástica. O remodelamento endometrial atinge seu ápice, aproximadamente, entre os dias 20 e 24 do ciclo menstrual, isto é, na janela de implantação, período intimamente relacionado à receptividade endometrial (Lopes *et al.*, 2011). Nesta fase, pode-se identificar a ocorrência de apoptose nas células epiteliais/ glandulares, que tem início na camada basal indo em direção à camada funcional. Nas células estromais, todavia, nota-se a ocorrência de uma onda de proliferação celular (von Rango *et al.*, 1998).

Apesar dos eventos acima descritos serem orquestrados pelos hormônios esteroides sexuais ovarianos, estes não são os únicos responsáveis pela ocorrência da decidualização. A participação de moléculas facilitadoras do processo também tem sido demonstrada, como é o caso da ativina A, que atua como um mediador autócrino/ parácrino durante o remodelamento das células endometriais (Gellersen e Brosens, 2014).

### **3.2- Ação da Ativina A no endométrio**

A expressão e a secreção da ativina A pelo endométrio humano foram comprovadas através de estudos que identificaram a presença local das

suas subunidades constituintes, assim como dos seus receptores específicos e do antagonista folistatina (Florio *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2002b).

Embora o papel fisiológico da ativina A no endométrio seja apenas parcialmente conhecido, há uma clara associação da mesma ao processo de decidualização das células estromais. Além disso, a ativina A também tem sido considerada como um fator importante durante o período inicial da gestação (Florio *et al.*, 2010a). Sua secreção ao longo do ciclo menstrual é regida pela progesterona, com elevação progressiva de seus níveis, apresentando pico na fase secretora tardia. Tal padrão de produção pelas células endometriais poderia estar relacionado a um potencial papel na invasão trofoblástica e na receptividade endometrial (Jones *et al.*, 2002a; Jones *et al.*, 2006).

De fato, Jones *et al.* demonstraram, pela primeira vez, através de experimentos *in vitro* que, ao adicionar ativina A a culturas de células endometriais humanas, ocorre a promoção dose-dependente da decidualização das células estromais (Jones *et al.*, 2002a). Tal relação também foi evidenciada *in vivo*, em 2003, quando um estudo identificou a existência de correlação entre os níveis de ativina A, encontrados no fluido proveniente de lavado uterino, e a espessura endometrial, bem como o dia do ciclo menstrual correspondente (Florio *et al.*, 2003).

Na gestação, a ação da ativina A também se faz presente. Além de agir diretamente na decídua do primeiro trimestre, onde é produzida em níveis elevados, estudos têm mostrado que a ativina A secretada no endométrio parece atuar também em receptores específicos presentes nos blastocistos,

auxiliando nos processos de invasão trofoblástica e implantação embrionária (He *et al.*, 1999; Florio *et al.*, 2010b).

A ativina A tem sido, ainda, relacionada a condições patológicas do endométrio. A expressão anormal deste fator de crescimento em mulheres com sangramento uterino disfuncional, abortamentos de repetição e endometriose sugere uma possível ação na fisiopatologia de tais doenças (Reis *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2012).

#### **4- Morte celular**

Morte celular é o processo de alterações irreversíveis que leva à paralisação da atividade biológica da célula (Darzynkiewicz *et al.*, 1997). Situações que requerem o descarte de células indesejáveis pelo organismo, seja de caráter patológico, como nos casos de mutação, infecção ou citotoxicidade, sejam meramente fisiológicas, como em processos vitais a exemplo da embriogênese, tornam a morte celular tema de suma relevância. (Darzynkiewicz *et al.*, 1997; Agic *et al.*, 2009). Nos organismos multicelulares, destacam-se dois importantes mecanismos de eliminação de células, denominados necrose e apoptose (Darzynkiewicz *et al.*, 1997; Wlodkowic *et al.*, 2010).

Necrose é o termo comumente utilizado para se referir à morte celular acidental (Wlodkowic *et al.*, 2010). Consiste em fenômeno passivo, independente de gasto energético, no qual a célula sofre um processo

degenerativo irreversível. Está sempre relacionada a uma causa patológica, sendo desencadeada por fatores externos, que podem ser físicos, químicos ou biológicos (ex.: altas temperaturas, radiação etc) (Darzynkiewicz *et al.*, 1997; Huppertz *et al.*, 1999).

Apoptose, termo que em grego remete à queda das folhas das árvores, foi sugerido por Kerr, em 1972, para descrever o processo até então denominado morte celular programada. Considerada um meio biológico vital, está intimamente relacionada à manutenção da homeostase do organismo. Representa um mecanismo altamente organizado e eficiente de descarte de células indesejáveis, na ausência de processo inflamatório (Kerr *et al.*, 1972). A apoptose pode estar relacionada a estímulos fisiológicos e patológicos, estando presente na embriogênese, *turnover* celular em tecidos saudáveis, atrofia e involução de alguns tecidos (ex: corpo lúteo), regressão de tumores, lesão de DNA e infecções (Kerr *et al.*, 1972; Wlodkowic *et al.*, 2010).

Embora o processo de desmontagem celular seja classicamente representado por estes dois mecanismos de bases morfológicas e bioquímicas distintas, os dois processos podem coexistir na mesma célula, tornando-se, algumas vezes, difícil a total diferenciação entre eles (Kerr *et al.*, 1972; Darzynkiewicz *et al.*, 1997).

Ademais, é válido destacar que, apesar de os dois fenômenos supracitados serem ainda considerados, por muitos autores, como referências quando o assunto é morte celular (Wlodkowick *et al.*, 2010), estudos recentes

têm atribuído ao tema uma maior complexidade, ao sugerirem a existência de uma gama de outras modalidades de morte celular, a serem citadas: autofagia, mitose catastrófica, senescência, morte celular programada tipo apoptose independente de caspase (*caspase-independent apoptosis-like programmed cell death*), entre outras (Leist e Jaatela, 2001; Kroemer e Martin, 2005; Levine e Yuan, 2005; Broker *et al.*, 2005).

#### **4.1– Necrose versus apoptose**

A necrose e a apoptose distinguem-se, do ponto de vista morfológico e bioquímico, sob diversos aspectos.

Na necrose, o processo de morte é desencadeado por uma injúria celular. Inicialmente, ocorre a turgescência da mitocôndria. Em seguida, a membrana plasmática sofre perda de sua integridade, levando à ocorrência de turgidez das organelas e da célula como um todo. Segue-se o rompimento de lisossomas e endossomas com a liberação de enzimas no citoplasma e consequente autólise. Há digestão aleatória do DNA. Por fim, o processo culmina na total destruição das membranas e extravasamento de conteúdo citoplasmático para o meio extracelular, resultando em uma resposta inflamatória local (Darzynkiewicz *et al.*, 1997; Grivicich *et al.*, 2007; Anazetti e Melo, 2007; Wlodkovic *et al.*, 2010).

A apoptose, por sua vez, é um mecanismo mais seletivo, que envolve as células de forma isolada (Mcconkey, 1993). Caracteriza-se por uma

sequência previsível de alterações celulares. Diferentemente da necrose, na apoptose a membrana mantém sua integridade e o volume citoplasmático sofre uma redução. A célula retraída perde a aderência com a matriz extracelular e as células vizinhas. Ocorrem marginalização e condensação da cromatina. As organelas citoplasmáticas permanecem intactas, exceto a mitocôndria que, em alguns casos, pode sofrer danos em sua membrana externa. Prolongamentos da membrana plasmática dão origem aos *bleebings*, espécies de bolhas que contêm citoplasma e organelas. O núcleo se divide em vários segmentos, preservando a sua membrana. O DNA é fragmentado por endonucleases em porções não aleatórias. São formados, então, os corpos apoptóticos, fragmentos celulares que contêm citoplasma, organelas e núcleo com membranas intactas (Williams *et al.*, 1974; Liu *et al.*, 1997; Grivicichi *et al.*, 2007; Wlodkowic *et al.*, 2010).

Os corpos apoptóticos possuem uma alteração da organização dos fosfolípidios em sua membrana, de modo que a fosfatidilserina, comumente expressa apenas no folheto interno da célula, fique exposta no folheto externo da mesma. Esta modificação da membrana atua como sinalizadora para que a célula seja fagocitada por macrófagos ou células vizinhas (Huppertz *et al.*, 1999).

Uma vez que não há liberação de conteúdo citoplasmático em meio extracelular, esta modalidade de morte celular não irá desencadear uma reação inflamatória (Strasser *et al.*, 2011).

De forma oposta à necrose, que é um mecanismo passivo, independente de ATP (adenosina trifosfato), a ocorrência da apoptose requer ativação gênica e síntese de proteínas, necessitando, portanto, de gasto energético (Huppertz *et al.*, 1999).

## **4.2- Mecanismos de regulação da apoptose**

A apoptose é regulada por uma complexa cascata de sinalização intracelular, na qual estão envolvidas uma série de moléculas, dentre as quais merecem destaque as proteínas pertencentes às famílias das caspases, Bcl-2 e fator de necrose tumoral (TNF).

### **4.2.1- Família das caspases**

O conjunto de alterações sofridas pelas células em apoptose deve-se à ativação de um sistema de proteínas denominadas caspases. Trata-se de proteases aspartato específicas que possuem cisteína no sítio ativo. Constituem peças chave no processo de apoptose, sendo responsáveis pela indução, transdução e amplificação dos sinais apoptóticos intracelulares. Podem ser encontradas entre as membranas mitocondriais e a matriz nuclear sob a forma de zimogênios, quando recebem a denominação de pró-caspases (Thornberry, 1997; Fan *et al.*, 2005; Anazetti e Melo, 2007).

Até o momento, já foram identificadas quatorze caspases. Aquelas envolvidas no processo de apoptose podem ser divididas em dois grupos:

iniciadoras (caspases -2, -8, -9, -10) e efetoras (caspases -3, -6, -7). As primeiras são responsáveis por iniciar o processo de apoptose, após estimulação. As pró-caspases iniciadoras, em suas formas inativas, possuem um pró-domínio longo. Este possui uma região de interação proteína-proteína, chamada domínio efetor de morte (*death effector domain- DED*), no caso das pró-caspases -8 e -10, ou domínio de recrutamento de caspase (*caspase recruitment domain- CARD*), nas pró-caspases -2 e -9. Tais regiões são responsáveis pela interação com moléculas adaptadoras e consequente deflagração da cascata apoptótica (Huppertz *et al.*, 1999; Fan *et al.*, 2005).

As pró-caspases efetoras possuem um pró-domínio curto ou inexistente. Quando ativadas, atuam na clivagem de substratos, que resultarão nas alterações celulares típicas da apoptose (Rupnarain *et al.*, 2004; Goldar *et al.*, 2015).

#### **4.2.2- Família Bcl-2**

A família Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein 2*) é composta por membros pró- apoptóticos (Bax, Bad, Bid, Bcl-xS, Bak, Box, Bik, Blk, Bim, Hrk, BNIP3), geralmente localizados na membrana externa da mitocôndria, e membros anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL, A1, Mcl-1), situados no retículo endoplasmático e envelope nuclear. O correto equilíbrio entre estes dois grupos de proteínas é responsável pela manutenção da homeostase do organismo. A proteína Bcl-2 é uma das mais estudadas. Ela age sequestrando a Bax ou competindo por sítios que seriam ocupados pela mesma, prevenindo a liberação do citocromo c e,

consequentemente, a permeabilização da membrana externa da mitocôndria. Também pode agir diretamente, bloqueando a ação das caspases (Petit *et al.*, 1997; Mignotte e Vayssiere, 1998; Grivicich *et al.*, 2007).

#### **4.2.3- Fator de Necrose Tumoral**

O fator de necrose tumoral (TNF), juntamente com outros 18 membros, faz parte da superfamília TNF. Esta citocina, que em princípio foi associada à inflamação e diminuição do crescimento de tumores, possui um papel importante em uma das vias de ativação da apoptose. Há dois receptores relacionados a esta família: o tipo I (TNFR1) e o tipo II (TNFR2). É a ligação do TNF ao receptor de morte TNFR1 que usualmente leva à ativação das caspases e deflagração da apoptose. Uma característica peculiar aos receptores de necrose tumoral é a existência de um trecho de aproximadamente 80 aminoácidos na região citoplasmática, chamado domínio de morte (*death-domain* – DD), intimamente relacionado ao recrutamento do maquinário responsável pela promoção da morte celular. (Curtin *et al.*, 2002; Shen e Pervaiz, 2006; Souza e Velásquez, 2008).

#### **4.2.4- Vias de sinalização da apoptose**

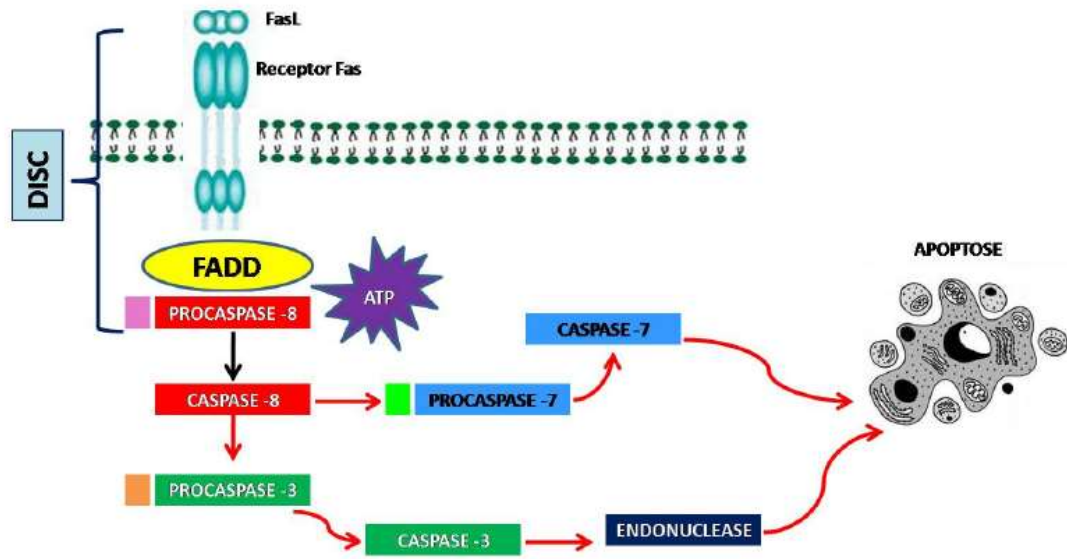
Para que a apoptose seja desencadeada é preciso que haja um estímulo inicial, que pode ser a união de ligantes com seus respectivos receptores, presença ou ausência de fatores de crescimento específicos ou

hormônios (ex.: esteroides), agentes quimioterápicos, choque térmico, irradiação, entre outros (Huppertz *et al.*, 1999; Grivicich *et al.*, 2007).

Em nível celular, existem basicamente duas vias de sinalização da apoptose, que, de maneira didática, podem ser classificadas em: via extrínseca e via intrínseca.

#### **4.2.4.1- Via extrínseca**

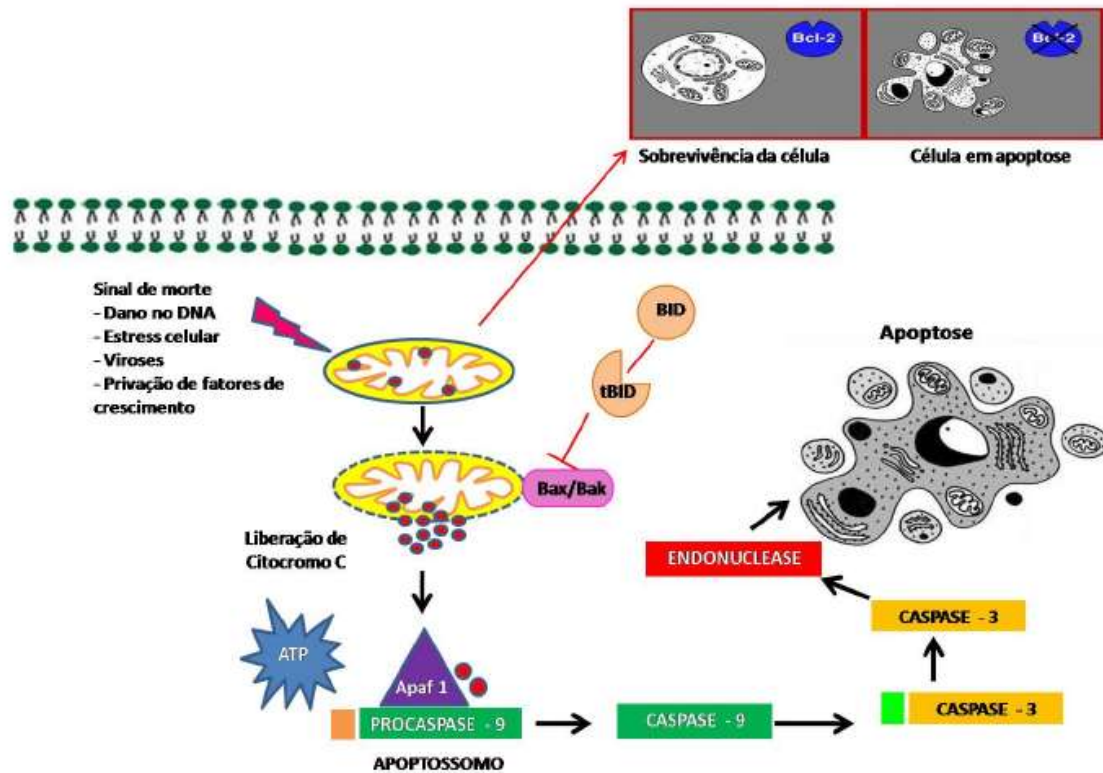
A via extrínseca, também denominada “via do receptor de morte”, se inicia através da ligação dos sinalizadores de morte, como, por exemplo, o TNF e o ligante Fas (FasL) aos seus receptores homônimos (TNFR1 e Fas, respectivamente), situados na membrana plasmática da célula (Huppertz *et al.*, 1999; Fan *et al.*, 2005). O domínio de morte existente na região citoplasmática destes receptores liga-se ao DED (domínio efetor de morte) das moléculas adaptadoras denominadas TRADD (*TNF receptor associates death domain*) e FADD (*Fas-associated death domain*). Neste momento, é formado um complexo denominado DISC (*death-inducing signaling complex*) que leva ao recrutamento e à ativação da pró-caspase-8. Esta, por sua vez, irá ativar a caspase-3, efetora, responsável por clivar proteínas ligadas às DNAases, tornando estas últimas ativas para realizar a quebra do DNA entre os nucleossomos (Goldar *et al.*, 2015) (Figura 6).



**Figura 6:** Representação esquemática da via extrínseca da apoptose (Fonte: Helen Lima Del Puerto).

#### 4.2.4.2- Via intrínseca

A via intrínseca da apoptose também é conhecida como via mitocondrial. Após a ocorrência de um insulto à célula (dano ao DNA, ativação de oncogenes, hipóxia etc), a mitocôndria recebe sinais que levam ao aumento da permeabilidade de suas membranas, resultando na liberação do citocromo c do seu espaço intermembranoso para o citosol. O citocromo c irá interagir com a molécula adaptadora Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*), formando um complexo denominado apoptossomo. Na presença de ATP, produzido pela mitocôndria, o apoptossomo irá recrutar e ativar a pró-capase-9. A partir daí, haverá a ativação da caspase-3 e, conseqüentemente, a deflagração das alterações celulares próprias do processo apoptótico (Wu *et al.*, 2013; Grivicich *et al.*, 2007) (Figura 7).



**Figura 7:** Representação esquemática da via intrínseca da apoptose (Fonte: Helen Lima Del Puerto).

A superfamília Bcl-2 é a responsável pelo controle da permeabilidade da membrana externa mitocondrial, apresentando, portanto, papel chave na via intrínseca da apoptose. As proteínas pró-apoptóticas, como a Bax, são as responsáveis pelo aumento desta permeabilidade e consequente liberação do citocromo c, enquanto as proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-2, impedem a apoptose, ao sequestrar a Bax ou competir por sítios que a mesma ocuparia. (Grivicich *et al.*, 2007).

#### 4.3- Detecção laboratorial da apoptose

Uma série de metodologias podem ser aplicadas na avaliação da apoptose, a partir da identificação de alterações morfológicas típicas deste tipo de morte celular. Constituem exemplos de técnicas disponíveis a citometria de fluxo, a microscopia eletrônica e a eletroforese (Palma, 2005).

O método atualmente considerado como o padrão ouro é a citometria de fluxo, que permite realizar, de forma rápida e precisa, a quantificação das populações celulares e a análise das alterações biológicas próprias da apoptose, como a diminuição do volume e o aumento da granulosidade das células (Darzynkiewicz *et al.*, 1997; Palma, 2005). O iodeto de propídio (PI) e a anexina-V-FITC são marcadores nucleares frequentemente utilizados nos ensaios de detecção e de quantificação da apoptose por citometria de fluxo. A associação do corante isotiocianato de fluoresceína (FITC) e anexina V é capaz de detectar as células em fase inicial de apoptose. Este método baseia-se no fato de que, nos estágios mais precoces da apoptose, a fosfatidilserina, normalmente situada na face interna da membrana plasmática, transloca-se para o lado externo da mesma. Os referidos marcadores agem ligando-se com alta afinidade à fosfatidilserina exposta, permitindo que as células sejam contadas pelo citômetro de fluxo. A utilização do corante iodeto de propídio, por sua vez, permite detectar alterações mais tardias da apoptose, como, por exemplo, aquelas relacionadas à permeabilidade das membranas, bem como reconhecer as células altamente danificadas e mortas. Por ser um marcador de DNA de alto peso molecular, o PI não consegue penetrar nas células em apoptose inicial, quando a membrana ainda encontra-se intacta (Palma, 2005).

#### 4.4- Apoptose e endométrio

A apoptose exerce um importante papel no endométrio humano através da eliminação de células senescentes ou disfuncionais a cada ciclo menstrual. Apesar de ocorrer predominantemente no epitélio glandular, as células apoptóticas também podem ser identificadas no estroma endometrial. A ocorrência de apoptose aumenta progressivamente ao longo do ciclo menstrual, atingindo um pico na fase secretora tardia do período menstrual. Este processo é regulado pelos hormônios sexuais em conjunto com uma série de mediadores parácrinos (Reis *et al.*, 2013).

Embora ainda não se conheça completamente os mecanismos moleculares envolvidos nesta modalidade de morte celular em relação às células endometriais, estudos mostram uma elevação da expressão do TNF durante o ciclo menstrual, que acompanha o aumento progressivo da apoptose ao longo da fase secretora, com pico na fase menstrual, sugerindo assim uma possível relação de causa-efeito entre estes dois eventos (Vaskivuo *et al.*, 2002).

Apesar de ainda não comprovada, também tem sido aventada a possibilidade de o TNF atuar como um sinal local pró-apoptótico, contribuindo para a ocorrência do desabamento endometrial e sangramento menstrual, processos intimamente associados a altos índices de apoptose (Tabibzadeh, 1996).

Mangioni *et al.* demonstraram que a produção do fator de necrose tumoral foi estimulada pela ativina A em células do estroma endometrial humano cultivadas *in vitro*, embora ainda não se tenha provado que este aumento possa, de fato, levar à estimulação da apoptose (Mangioni *et al.*, 2005).

A expressão de Bcl-2, proteína reguladora da via intrínseca da apoptose, foi demonstrada como participante dos processos de proliferação e apoptose das células endometriais ao longo do ciclo menstrual (von Rango *et al.*, 1998).

Até o presente momento não se tem conhecimento de nenhum estudo, na literatura nacional e mundial, acerca da ação da ativina A e de seu antagonista folistatina sobre a apoptose em células endometriais. Considerando o envolvimento da ativina A na decidualização endometrial e a sua participação em diversos eventos biológicos, incluindo a regulação da apoptose em outros tecidos, o presente estudo foi desenhado para investigar uma possível relação destas moléculas como moduladores do processo de proliferação e apoptose/morte celular no endométrio humano.

## **II- OBJETIVOS**

### **1- Objetivo Geral**

Investigar se a ativina A é capaz de modular a apoptose/morte celular em células estromais do endométrio humano (HESC) cultivadas *in vitro* e avaliar os possíveis mecanismos regulatórios envolvidos no processo.

### **2- Objetivos específicos**

1) Avaliar o efeito da ativina A sobre as taxas de apoptose e de morte total em HESC cultivadas *in vitro*.

2) Confirmar o efeito antagonista da folistatina sobre a ação da ativina A nas HESC cultivadas *in vitro*.

3) Avaliar o efeito da ativina A sobre as concentrações de TNF liberadas nos meios de cultura das HESC.

4) Avaliar o efeito da ativina A sobre a expressão gênica de Bcl-2, Bax, caspase-3 e caspase-8 em HESC cultivadas *in vitro*.

### **III- MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **1- Pacientes e amostras celulares**

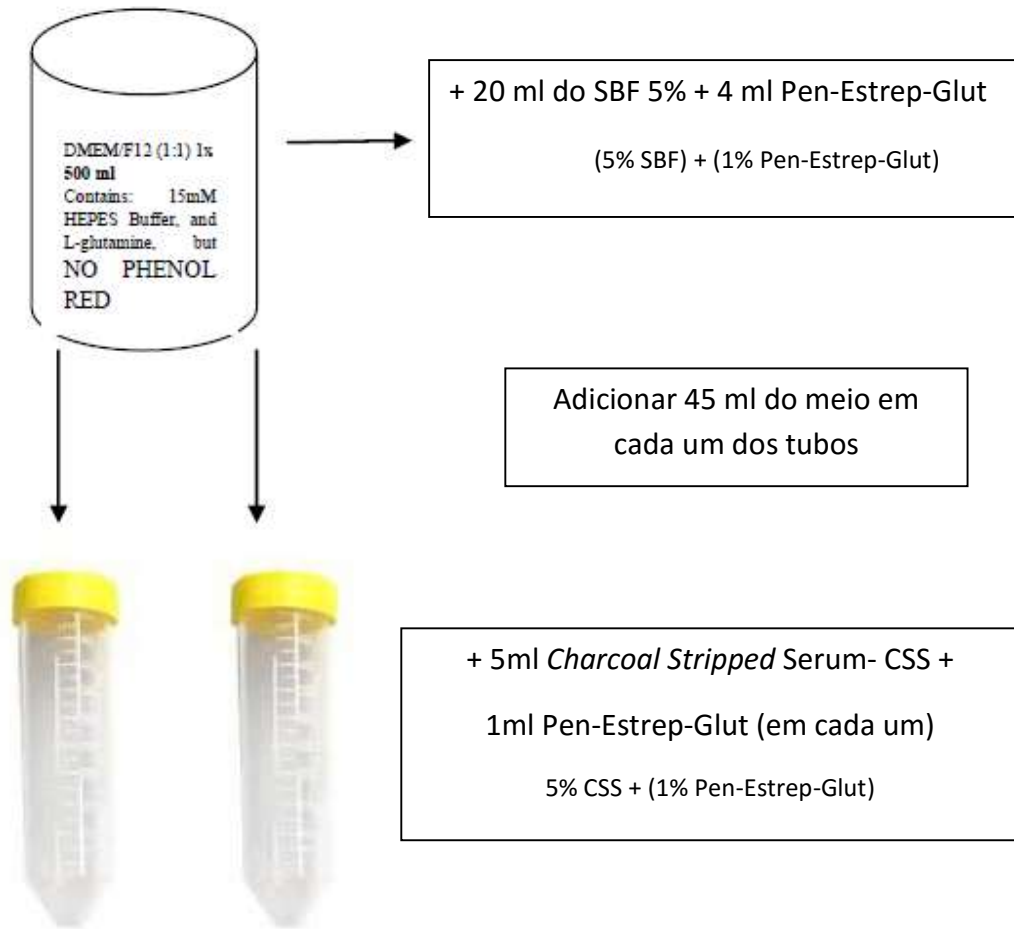
Foram estabelecidas culturas de células estromais do endométrio humano (HESC), obtidas de 11 mulheres saudáveis, com ciclos menstruais regulares e nenhuma disfunção endometrial aparente. As participantes do estudo foram selecionadas entre as pacientes do Laboratório de Reprodução Humana Professor Aroldo Fernando Camargos- Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), em propedêutica para tratamento de infertilidade por salpingotripsia bilateral prévia ou fator masculino. Todos os sujeitos da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição. Não houve nenhum prejuízo aos tratamentos em curso e a participação no estudo foi de caráter voluntário.

#### **2- Culturas celulares primárias**

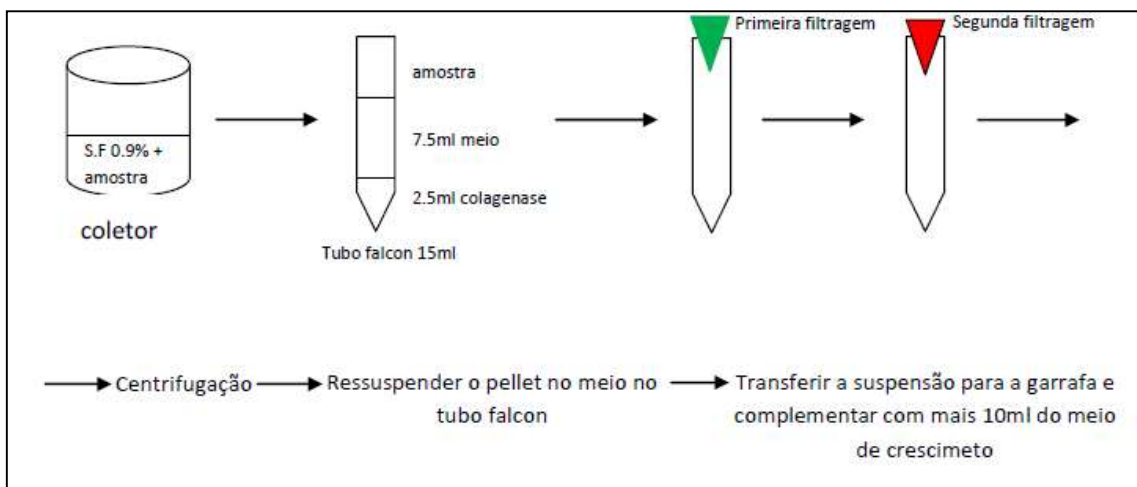
Biópsias endometriais foram coletadas na fase proliferativa do ciclo menstrual, através de dispositivo aspirativo descartável (Pipelle), em duas situações: 1) logo após vídeo-histeroscopia diagnóstica (VHD); ou 2) imediatamente antes de videolaparoscopia (VLP) para tentativa de reversão de salpingotripsia bilateral prévia. Todas as pacientes apresentavam endométrio sem alterações macroscópicas, o que foi comprovado através da própria VHD

ou por meio de exame ultrassonográfico transvaginal, no caso das pacientes submetidas à VLP.

As células estromais do endométrio foram isoladas conforme descrito previamente (Rocha *et al.*, 2012). Após coletadas as amostras, o material foi encaminhado imediatamente ao laboratório, em tubo falcon de 15 ml, contendo soro fisiológico 0,9% (SF 0,9%). Sob a capela de fluxo, foi realizada pipetagem do tecido para um novo tubo e feita lavagem com PBS para retirada de coágulos e excesso de sangue. O tecido foi então gentilmente picotado em pequenos pedaços e digerido por 1 hora, a 37°C, com 2,5 ml de colagenase tipo 1 (1%) e 7,5 ml de meio DMEM/F12 (1:1) 1x (Gibco-Life Technologies, Paisley, UK), suplementado com soro bovino fetal 5% (SBF 5%) e Penicilina-Estreptomicina-Glutamina (Pen-Estrep-Glut) (Gibco-Life Technologies). O protocolo de preparo do meio de crescimento encontra-se esquematizado na Figura 8. O tubo foi levado à estufa por três períodos de 20 minutos, intercalados com retirada para homogeneização. As células estromais foram separadas por meio de filtragem, sequencialmente através de filtros de nylon de 50 µm e 20 µm. Após a remoção de porções de tecido não digerido, contendo glândulas, as células foram centrifugadas por 8 minutos, a 1200 rpm, em temperatura ambiente. O *pellet* foi então ressuspenso em 10 ml de meio suplementado com SBF5% + antibiótico e as células foram plaqueadas e cultivadas a 37°C em incubadora com 95% de ar/ 5% de CO<sub>2</sub> (Figura 9).

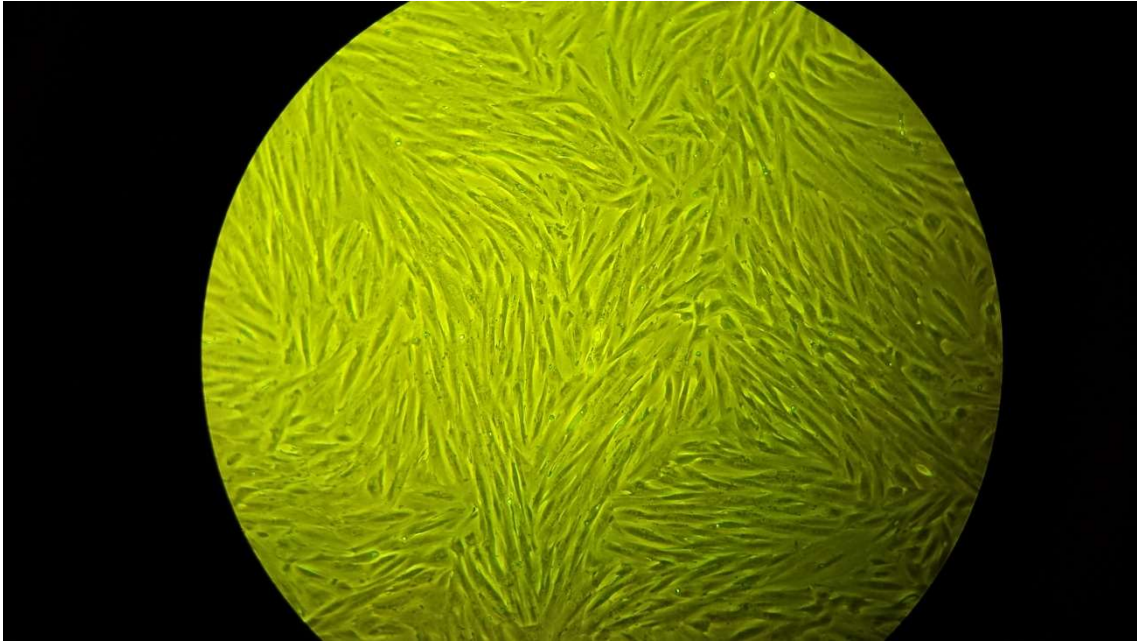


**Figura 8:** Esquema ilustrativo do protocolo de preparo do meio de crescimento para cultivo de células estromais do endométrio humano (Fonte: Laboratório de Reprodução Humana Professor Aroldo Fernando Camargos-HC/UFMG. Gentilmente cedido por Cynthia Dela Cruz.)



**Figura 9:** Esquema ilustrativo do protocolo para cultivo de células estromais do endométrio humano (Fonte: Laboratório de Reprodução Humana Professor Aroldo Fernando Camargos-HC/UFMG. Gentilmente cedido por Cynthia Dela Cruz.)

O crescimento das células foi acompanhado, com a realização periódica das trocas de meio. A Figura 10 mostra o aspecto da placa contendo células estromais do endométrio humano em confluência.



**Figura 10:** Poço contendo células estromais do endométrio humano em confluência.

Como o crescimento das HESC nas placas de cultivo apresentam velocidades individuais e variáveis, e as biópsia foram realizadas em ocasiões distintas, optamos pela realização de subculturas e subsequente congelamento das amostras. Dessa forma, tornou-se possível a execução dos tratamentos em um momento único, proporcionando uma maior uniformidade aos experimentos. As amostras foram congeladas nas segunda e terceira passagens (P2 e P3).

Após o descongelamento, quando as subculturas atingiram a confluência de 80 a 90%, foi realizada a troca do meio de cultura para outro sem SBF, e 24 horas depois, as células foram tratadas com: meio de cultivo apenas (grupo controle) ou ativina A isoladamente (25 ng/ml) ou ativina A e folistatina (25 ng/ml de ativina A e 250 ng/ml de folistatina). Após 24 horas do tratamento, os poços destinados à realização de ELISA e PCR tiveram os sobrenadantes aspirados e armazenados a -80°C para posterior detecção das concentrações de TNF através do ensaio ELISA, enquanto as células aderidas aos poços foram submetidas à ação do Trizol, para armazenamento em freezer e subsequente utilização no PCR. Os demais poços forneceram as células que foram encaminhadas imediatamente para processamento por citometria de fluxo.

### **3- Detecção da apoptose por citometria de fluxo**

#### **3.1- Avaliação da morte celular por coloração com anexina V e iodeto de propídio**

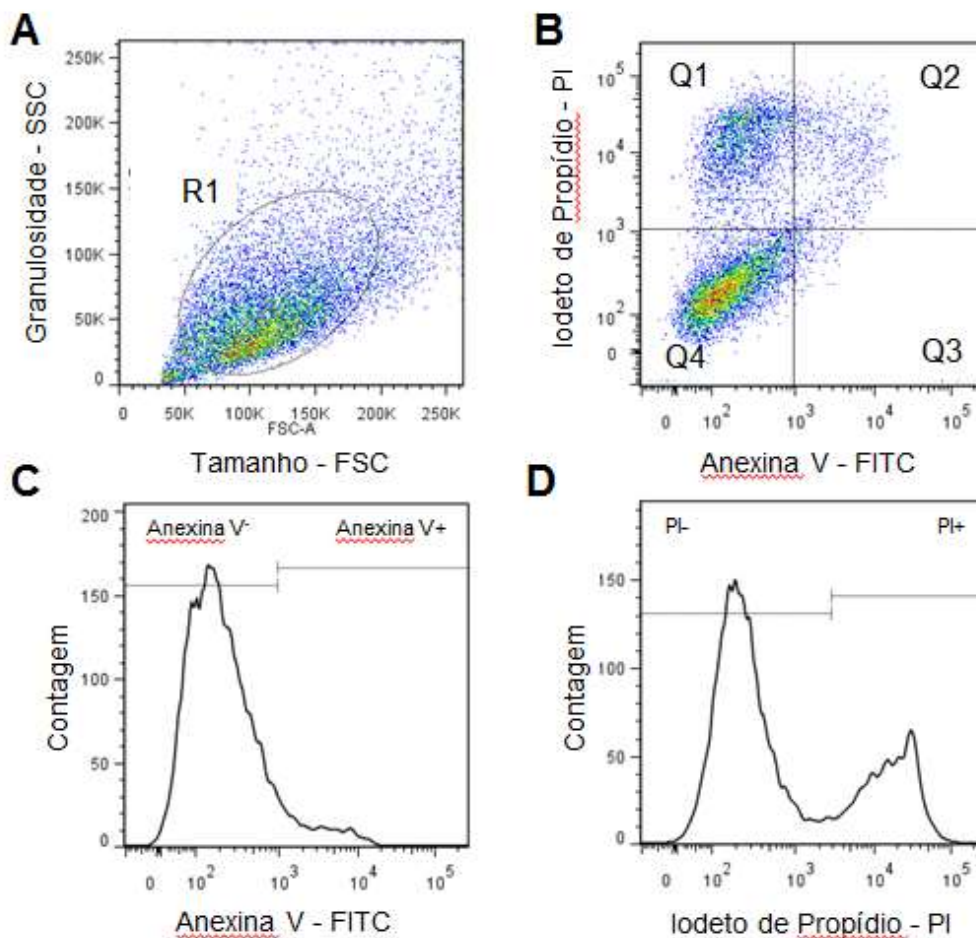
Para avaliar as fases do processo de morte celular (apoptose recente e tardia, e morte efetiva) utilizou-se a marcação com anexina V e iodeto de propídio (PI) para as células estromais do endométrio de mulheres saudáveis. Inicialmente, após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e ressuspensas em solução tampão de ligação (*binding buffer*) (eBioscience, San Diego, CA, USA). Na fase inicial da apoptose, a molécula intracelular fosfatidilserina transloca-se para a membrana

extracelular. Uma vez na superfície da membrana, a fosfatidilserina pode ser detectada pelo citômetro de fluxo devido à ligação da anexina V conjugada ao fluorocromo FITC. Desta forma, adicionou-se anexina V- FITC (eBioscience) diluída em *binding buffer* às amostras, com o tempo de incubação de 15 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas em *binding buffer* e ressuspendidas em 200µl dessa solução. No momento da aquisição no citômetro de fluxo (FACSCantoll - Becton & Dickinson Company), adicionou-se, no ato da leitura da amostra, 5µl de solução de iodeto de propídio (PI) (BDbioscience, San Jose, CA, USA). O número mínimo de eventos adquiridos foi de 100.000 na região de células viáveis. Todas as leituras foram feitas em baixa velocidade (Low). Após aquisição, analisou-se a expressão de anexina V (FL1-FITC) e PI (FL3-PE-Cy5.5) utilizando-se o programa FlowJo 7.6.5™ Tree Star (Ashland, OR, USA).

### **3.2- Estratégia de análise para a avaliação da morte celular por anexina V e iodeto de propídio**

Para a realização da análise dos dados obtidos pelo citômetro de fluxo, através do programa FlowJo 7.6.5 software (Tree Star), foi adotado um critério único para as diferentes condições de culturas. Primeiramente, foram criadas diferentes regiões (*gates*), selecionando-se a população de células de interesse (R1) (Gráfico1-A). Essa seleção foi representada em gráficos de pontos de tamanho por granulosidade (FSC x SSC) (Gráfico1-A). A partir da seleção da região, para a análise de anexina V e PI, construiu-se um segundo gráfico de FITC *versus* PI (FL1 x FL3) (Gráfico1-B). Quadrantes foram

posicionados para a determinação das populações positivas para uma molécula “*single positive*” (Q1 e Q3), duplo positiva “*double positive*” (Q2) e duplo negativas “*double negative*” (Q4). Gráficos de histograma foram construídos para a avaliação da expressão de anexina V (Gráfico1-C) e iodeto de propídio (Gráfico1-D). Realizou-se esse posicionamento do quadrante de acordo com as células não marcadas. O resultado foi expresso em frequência da taxa de morte, uma vez que o valor expresso nos gráficos de barra corresponde ao somatório dos valores encontrados nos quadrantes Q1, Q2 e Q3 (Gráfico1-B).



**Gráfico 1:** Estratégia de análise utilizada para avaliação da morte celular por expressão de anexina V e iodeto de propídio (PI) nas células do estroma endometrial submetidas a diferentes

tratamentos. Células do estroma endometrial foram marcadas para anexina V e PI após cultura com o meio apenas, com ativina A isoladamente (25 ng/ml) e com a combinação de ativina A 25 ng/ml e folistatina (250 ng/ml), e analisadas utilizando-se o citômetro de fluxo. **(A)** Gráfico de pontos de tamanho versus granulocidade (FSCxSSC) foram construídos, e selecionou-se a população de interesse (R1). Após a seleção da população, realizou-se a avaliação da expressão de anexina V + PI utilizando gráficos de pontos **(B)**. O posicionamento dos quadrantes levou em consideração o controle de isotipo para FITC e PI. Determinou-se a frequência total de morte/apoptose das células pelo somatório dos valores de Q1, Q2 e Q3 **(B)**. Para a análise individual das marcações, realizou-se a análise em gráficos de histogramas **(C e D)**.

### **3.3- Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de TNF**

As concentrações de TNF presentes nos meios de cultura das HESC foram avaliadas usando um kit comercial para ELISA (ab46087 Abcam, Cambridge, UK), conforme as especificações do fabricante. Resumidamente, o diluente do ensaio (100 µl), amostras e padrões (100 µl) foram adicionados a uma placa de 96 poços revestida de anticorpos, que foi selada e incubada durante 3 horas a 18-25°C (temperatura ambiente). A placa foi então lavada com tampão de lavagem e incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase por mais 30 minutos a temperatura ambiente. Após a lavagem com tampão, uma solução com substrato (tetrametilbenzidina) foi adicionada por 12 a 15 minutos, em temperatura ambiente, e a reação foi paralisada ao adicionar 2 N de ácido sulfúrico. Em seguida, a absorbância foi lida a 450 nm. Todas as amostras foram executadas na mesma placa. De acordo com o fabricante, a dose mínima de TNF detectável por este kit foi de 8 pg/ml e o coeficiente de variação intra-teste foi de 3,3%.

### **3.4- Extração de RNA e reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real**

### **3.4.1- Extração de RNA total**

A expressão dos genes alvo (caspase 3, caspase 8, Bcl-2, Bax) foi avaliada por PCR em tempo real após a extração de RNA total das células estromais do endométrio humano.

Para a extração do RNA total, o *pellet* das células foi ressuspenso em 1ml de Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), utilizando-se o protocolo para o reagente Trizol®, sem modificações. Ao término do protocolo, o RNA total foi ressuspenso em 20 µl de água *diethylpyrocarbonate* (H<sub>2</sub>O DEPC), livre de ribonuclease (RNase) e desoxirribonuclease (DNase) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para biologia molecular e quantificado no NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA), utilizando alíquota de 2 µl. Com o objetivo de eliminar uma possível contaminação por DNA genômico, as amostras de RNA foram tratadas com *DNase I Amplification grade* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e, em seguida, requantificadas no NanoDrop.

### **3.4.2- Síntese do DNA complementar pela transcrição reversa (RT)**

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando-se inicialmente 1 µg de RNA total em 22 µl de volume da reação final (45 ng RNA/µl), sintetizados a partir do kit SuperScript® III First-Strand Synthesis

System for RT-PCR( Invitrogen®). O RNA foi primeiramente incubado a 65 °C, por 5 minutos, com 50 ng/ µl de Randon Hexamers e tampão (Annaling buffer). Em seguida, foi novamente incubado com 10 µl de 2x First Strand Reaction Mix (10mm MgCl<sub>2</sub> e 1 mm dNTP mix) e 2 µl da enzima Super Script III/ RNase out, por reação durante 10 minutos a 25°C, depois por 50 minutos a 50°C. A reação foi então incubada a 85°C durante 5 minutos, finalizada a 4°C e armazenada a -80°C até a execução da PCR.

### **3.4.3- Seleção, desenho e síntese dos oligonucleotídeos iniciadores**

Os oligonucleotídeos iniciadores designados para a transcrição reversa e PCR em tempo real, para a verificação da expressão de genes relacionados à apoptose, foram estudados e selecionados com base na análise da sequência descrita no GeneBank, obtida através do programa BLAST. As sequências foram posteriormente analisadas no site da empresa Integrated DNA Technologies (IDT), que permitiu a elaboração dos iniciadores (*primers*) para as regiões alvo de cada gene, de acordo com as nossas especificações para as condições de cada *primer*.

Foi utilizado o gene que codifica a proteína ribossomal S26 como gene de referência para a correção da expressão dos genes alvo na PCR em tempo real.

Os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen, recebidos liofilizados e, em seguida, ressuspensos em H<sub>2</sub>O DEPC, livre de RNase e DNase

(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), para concentração final de 100 pmol/μl (concentração para estoque). Foram preparadas alíquotas de 5 μmol (concentração de uso para a PCR em tempo real) no dia da PCR em tempo real. Para a realização do aliquotamento dos *primers*, foram empregadas ponteiras com barreira. Durante todo o procedimento, foram utilizadas luvas e máscara. Na Tabela 1 estão descritas a localização e a sequência dos oligonucleotídeos sintetizados.

Primers	Sequência de nucleotídeos (nt)	Fragmento amplificado	GenBank Accession number
S26HS (senso)	5'- TGTGCTTCCCAAGCTGTATGTGAAG -3'	75	NM_001029.3
S26HS (anti-senso)	5'- CGATTCCTGACTACTTTGCTGTGAA -3'		
BAXHS (senso)	5'- TCTACTTTGCCAGCAAAGTGGTGC -3'	80	NM_138765.3
BAXHS (anti-senso)	5'- TGTCCAGCCCATGATGGTTCTGAT -3'		
Bcl-2Hs (senso)	5'- ATTCCTGCATCTCATGCCAAGGG -3'	90	NM_000657
Bcl-2Hs (anti-senso)	5'- TGTGCTTTGCATTCTTGGACGAGG -3'		
Casp8Hs (senso)	5'- GGAAGCAAGAACCCATCAAG -3'	92	XM_006712791.1
Casp8Hs (anti-senso)	5'- CTCAGGAAGGACAGATTGC -3'		
Casp3Hs (senso)	5'- GTAGATGGTTTGAGCCTGAG -3'	106	NM_032991.2
Casp3Hs (anti-senso)	5'- CCAGTGCGTATGGAGAAATG -3'		

**Tabela 1:** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de PCR em tempo real.

#### 3.4.4- PCR em tempo real

Foi realizada a PCR em tempo real das amostras de cDNA resultantes da RT, através do equipamento de sistema de PCR em tempo real ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System (Laboratório de Reprodução Humana HC/UFMG), utilizando-se o Kit SYBR Green® PCR Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram aplicadas em placa de 96 poços (ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em duplicata, no volume final de reação de 20 µl. Em cada poço foram pipetados 2 µl (90 ng de cDNA total) de amostra e adicionados posteriormente 18 µl do mix contendo 10 µl do SYBR Green® PCR Master Mix Kit, 0,5 µl de cada *primer* (senso e antisenso) (1 µmol /cada) e o volume final completado com H<sub>2</sub>O livre de RNase e DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A placa foi selada com adesivo óptico (ABI PRISM® Optical Adhesive Covers, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e recebeu um *spin* para trazer todo o volume para o fundo do poço. Em seguida, a placa foi levada ao termociclador para iniciar as reações. Durante todo o processo, luvas, máscara e ponteiros com barreira foram utilizadas. As reações de PCR em tempo real ocorreram no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 52°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/0,15 min. e 50°C/1 min. Ao término da ciclagem, foi realizada a curva de *melting* a 60°C por um minuto, para a construção da curva de dissociação, que tem por objetivo determinar a especificidade dos fragmentos amplificados.

Os resultados foram expressos como  $\Delta Ct$ , obtido pela diferença entre o limiar de amplificação exponencial da reação de PCR (*cycle threshold*, Ct) do gene alvo e o Ct do S26.

### **3.5- Análise estatística**

O tamanho da amostra foi calculado para detectar uma diferença mínima de 1,3 desvios-padrão entre os grupos do experimento, com poder estatístico de 0,8 e  $\alpha = 0,05$ . A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de normalidade de D'Agostino & Pearson com o programa Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Uma vez que o teste de normalidade indicou que os índices de morte celular não se afastaram significativamente da distribuição normal, os dados foram expressos como médias  $\pm$  desvio padrão e comparados usando testes *t* com correção de Bonferroni. As concentrações de TNF e os valores de  $\Delta Ct$  foram expressos como medianas e quartis e comparados por análise de variância não-paramétrica seguida pelo teste de Dunn. Correlações lineares foram testadas com o coeficiente de Spearman, e  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

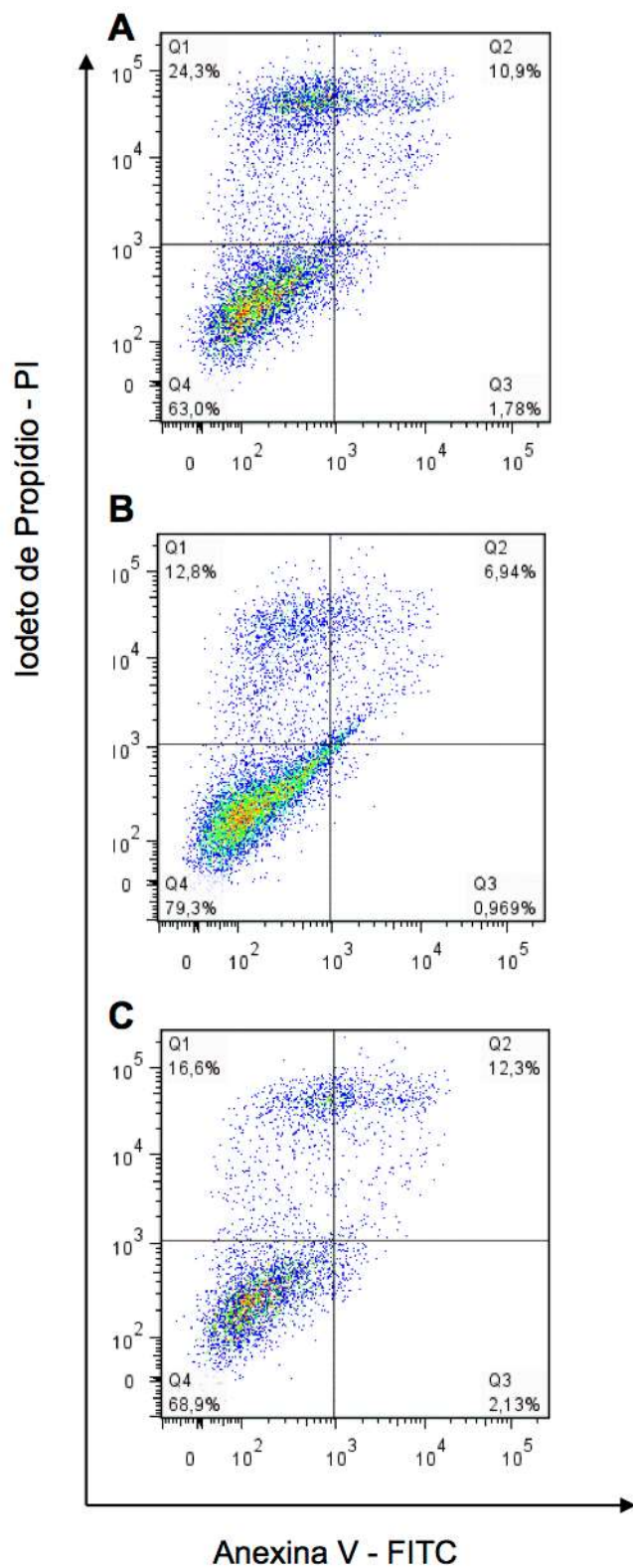
## **IV- RESULTADOS**

### **1- Detecção da apoptose por citometria de fluxo**

Os resultados das leituras no citômetro de fluxo, utilizando a marcação dos núcleos com iodeto de propídio e da fosfatidilserina exposta na membrana plasmática com a associação de anexina V- FITC, foram capazes de evidenciar as células em diferentes etapas do processo de morte celular. Foram semeadas culturas de HESC provenientes de 11 pacientes saudáveis, conforme descrito anteriormente. Cada uma delas foi submetida a três formas de tratamento: apenas com meio de cultura (grupo controle), com ativina A (25 ng/ml) e com ativina A (25 ng/ml) + folistatina (250 ng/ml). O Gráfico 2 mostra a marcação das células por estes corantes, 24 horas após o tratamento. A seleção da população celular de interesse foi realizada através dos gráficos de pontos de FSCxSSC (vide o capítulo de Materiais e Métodos para maiores detalhes) e a partir daí, deu-se a construção dos gráficos de ponto de fluorescência 1 (FL1 - FITC) versus fluorescência 3 (FL3 - PI), que mostram a detecção dos corantes anexina V e PI através de quatro quadrantes. O quadrante Q1 mostra as células coradas apenas por PI, representando as células no estágio mais avançado, isto é, efetivamente mortas, sem possibilidade de reversão do processo apoptótico. Em Q2, podem ser visualizadas células coradas por ambos os marcadores (anexina V e PI), estando, portanto, em fase tardia de apoptose, também irreversível, na qual já há exposição do DNA. O quadrante Q3 evidencia as células que foram marcadas apenas pela anexina V e ainda encontram-se em um estágio inicial

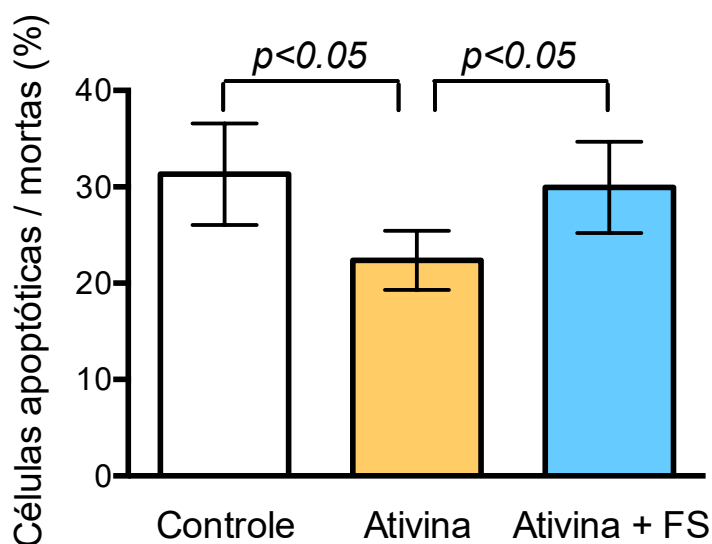
da apoptose, denotando um início recente da mesma. Já em Q4, estão as células vivas, que não foram coradas.

“Total de células apoptóticas/ células mortas” foi a expressão por nós utilizada para nos referirmos à soma de células dos grupos Q1, Q2 e Q3. Este grupo representou o número total de células que, no momento da leitura pelo citômetro de fluxo, se encontravam em qualquer um dos estágios do processo de morte celular acima citados.



**Gráfico 2:** Detecção da anexina V conjugada com FITC e iodeto de propídio em células estromais do endométrio humano cultivadas sem estímulo **(A)**, tratadas unicamente com ativina A **(B)**, e tratadas com ativina A + folistatina **(C)**.

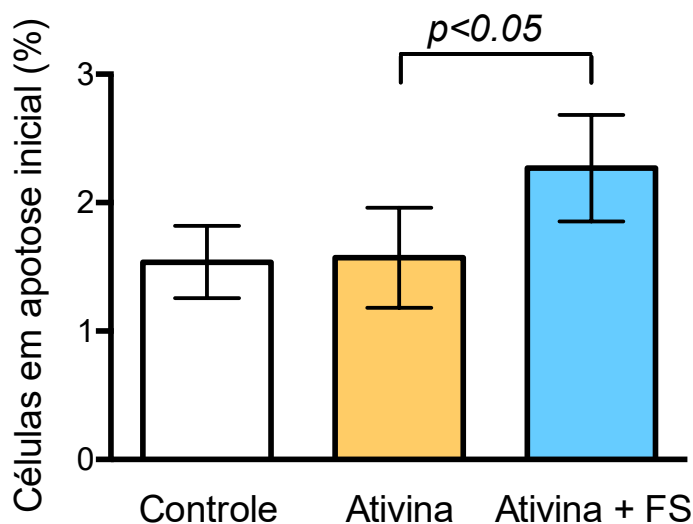
A ativina A induziu uma redução significativa na frequência total de células apoptóticas/células mortas, quando comparadas com o grupo controle, sem tratamento ( $22,4 \pm 3,0\%$  vs.  $31,3 \pm 5,2\%$ ,  $p < 0,05$ , Gráfico 3). Quando as células foram tratadas com a ativina A em associação com a folistatina, a frequência total de células mortas foi restaurada a níveis similares aos do grupo controle ( $30,0 \pm 4,7\%$ , Gráfico 3).



**Gráfico 3:** Frequência total das células mortas, incluindo apoptose (células positivas para qualquer dos marcadores: anexina V-FITC, PI ou ambos). O gráfico de barras (médias  $\pm$  desvio padrão) mostra que a ativina A protegeu as células do estroma endometrial cultivadas *in vitro* da apoptose/ morte celular, o que foi evidenciado por leitura em citômetro de fluxo, após 24 horas dos tratamentos.

A proporção de células em apoptose inicial detectadas após 24 horas de incubação foi similar no grupo tratado exclusivamente com ativina A e no grupo controle, porém significativamente aumentada nas células tratadas

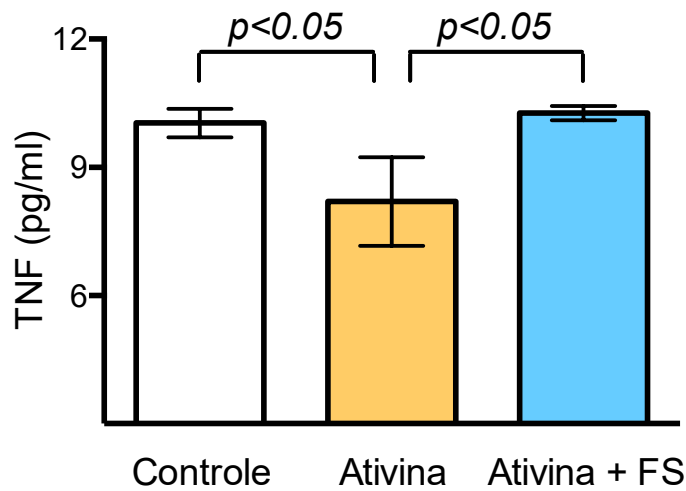
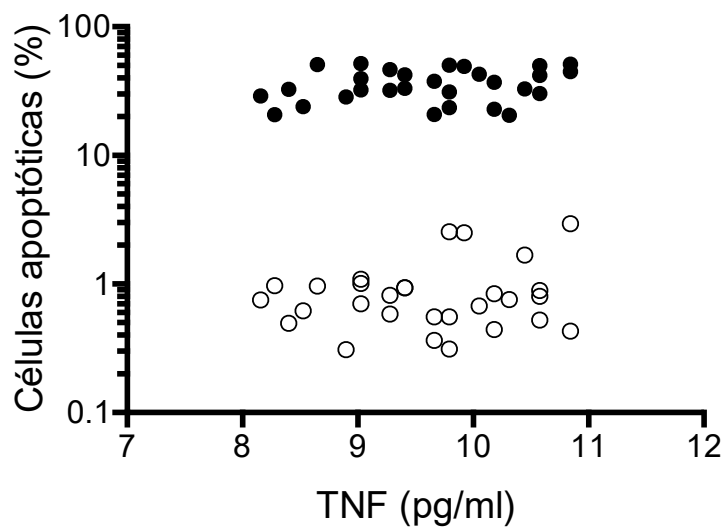
com ativina A + folistatina ( $2,3 \pm 0,4\%$  vs.  $1,6 \pm 0,4\%$  no grupo tratado exclusivamente com ativina A,  $p < 0,05$ , Gráfico 4).



**Gráfico 4:** Proporção de HESC em apoptose inicial (positivo para anexina V-FITC apenas).

## 2- Ensaio imunoenzimático, ELISA

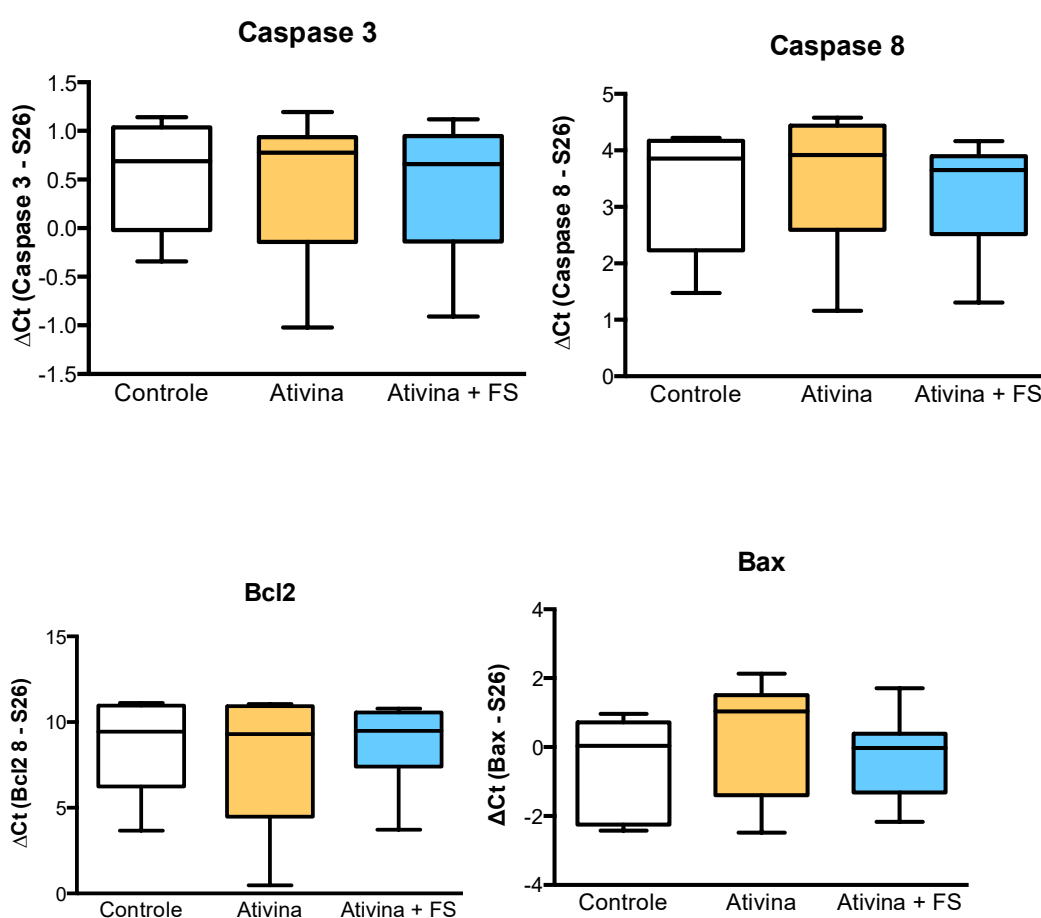
A ativina A induziu uma diminuição nas concentrações de TNF nos meios de cultura das HESC, quando comparados com os controles ( $8,9 [7,0-9,8]$  pg/ml vs.  $10,4 [9,0-10,6]$  pg/ml,  $p < 0,05$ , Gráfico 5-A). A adição de folistatina foi capaz de reverter completamente o efeito da ativina A na liberação de TNF ( $10,3 [9,9-10,6]$  pg/ml,  $p < 0,05$  vs. grupo tratado exclusivamente com ativina A, Gráfico 5-A). Curiosamente, não pôde ser estabelecida uma correlação linear entre as concentrações de TNF nos meios de cultura e a proporção total de células apoptóticas/ células mortas ( $r = 0,19$ ,  $p = 0,030$ ) ou o índice de apoptose inicial ( $r = 0,02$ ,  $p = 0,91$ ) (Gráfico 5-B).

**A****B**

**Gráfico 5:** Avaliação do efeito da ativina A, e de seu antagonista folistatina, sobre as concentrações de TNF liberadas nos meios de cultura das HESC. **(A)** Concentrações de TNF nos meios de cultura das células do estroma endometrial sem estimulação (controle) ou tratadas com ativina A ou com ativina A +folistatina. Os dados estão expressos em medianas ou quartis. **(B)** Ausência de correlação entre as concentrações de TNF nos meios de cultura e a frequência total de células mortas (representada pelos círculos pretos) ou a proporção de células em apoptose inicial (representada pelos círculos brancos).

### 3- PCR em tempo real

Não foram observadas diferenças significativas da expressão dos genes reguladores da apoptose (Bax, Bcl-2, caspase-3 e caspase-8) entre as culturas de HESC tratadas com ativina A apenas, com ativina A + folistatina e grupo controle.



**Gráfico 6:** Comparação da distribuição da expressão dos genes reguladores da apoptose nas HESC sem estimulação (controle), com ativina A isoladamente e com ativina A e folistatina. Não houve diferença estatisticamente significativa da expressão gênica entre os grupos.

## V- DISCUSSÃO

O presente estudo buscou determinar se a ativina A e/ou seu antagonista folistatina são capazes de modificar a taxa de sobrevivência de células endometriais humanas. Identificou-se uma redução do total de células apoptóticas/ células mortas (mas não da taxa de células em apoptose inicial, isoladamente) em culturas do estroma endometrial humano, 24 horas após o tratamento com ativina A. A adição de folistatina à ativina A promoveu a reversão desta tendência, levando a uma taxa total de células apoptóticas/ células mortas a níveis próximos àqueles encontrados no grupo controle, e ao aumento da proporção de células em apoptose inicial.

Estes resultados indicam que, após 24 horas do estímulo, a ativina A exógena não foi capaz de prevenir novas células de iniciarem o processo de apoptose. Possivelmente, a atividade da ativina A iniciou-se mais cedo e não foi capturada no momento da leitura pelo citômetro. Como a ação da ativina A administrada, teoricamente, já teria se esgotado, as células ainda vivas não estariam protegidas por seu efeito anti-apoptótico. Portanto, o número de células que começaram a entrar em apoptose após 24 horas foi semelhante ao do grupo controle.

Apesar desta ação rápida e precoce, após 24 horas, o efeito da ativina A ainda pôde ser notado indiretamente, através da proporção reduzida de células em estágio tardio de apoptose ou já efetivamente mortas, quando comparadas às células que não foram tratadas com a ativina A.

A dose de folistatina utilizada conseguiu antagonizar o efeito protetor da ativina A em relação à apoptose. Ao se ligar à ativina A, a folistatina foi capaz de impedir sua união aos receptores ActRIIB e a ativina não conseguiu impedir a apoptose. Ao analisar as células 24 horas depois dos tratamentos, o número de células em apoptose/morte celular estava semelhante ao do grupo controle.

Um achado interessante do presente estudo foi a identificação de um aumento da proporção de células em apoptose inicial, visualizado no grupo em que a folistatina foi adicionada. Conforme descrito por Florio *et al.*, as HESC cultivadas *in vitro* podem continuar produzindo ativina endógena em doses menores do que as utilizadas em nosso experimento, no entanto ainda significativas (Florio *et al.*, 2007). Diante deste fato, a folistatina administrada às células estromais pode ter mantido uma ação antagônica às doses endógenas de ativina A, mesmo após o efeito da ativina A exógena ter cessado, impedindo a inibição da apoptose e permitindo que um número maior de células iniciasse o processo apoptótico.

Conforme anteriormente contextualizado, a ativina A tem sido descrita como um regulador da decidualização e da receptividade endometrial (Jones *et al.*, 2002a; Jones *et al.*, 2002c; Florio *et al.*, 2010a). A decidualização é um importante fenômeno, caracterizado por alterações morfológicas e funcionais do estroma endometrial, que ocorre na fase secretora do ciclo menstrual, cujo objetivo é fornecer suporte à invasão trofoblástica e à implantação embrionária. O remodelamento uterino é regulado pelos

hormônios sexuais ovarianos e facilitado por uma gama de citocinas e fatores de crescimento que agem como mediadores parácrinos (Gellersen e Brosens, 2014). A expressão da ativina A pelo endométrio é estimulada pela progesterona, apresentando concentrações crescentes ao longo do ciclo menstrual, com pico na fase secretora tardia (Jones *et al.*, 2006).

Os hormônios esteroides ovarianos têm sido relacionados ao controle da apoptose no endométrio, através de sua influência na expressão do Bcl-2, proteína anti-apoptótica envolvida na via intrínseca da apoptose. Na fase proliferativa do ciclo menstrual, os altos níveis de estrogênio aumentam a transcrição do Bcl-2, inibindo a apoptose. Após a decidualização, quando as células endometriais estão sob a influência da progesterona, os mecanismos envolvidos apresentam uma maior complexidade (Reis *et al.*, 2013). von Rango *et al.* demonstraram um aumento na atividade apoptótica em células epiteliais/glandulares do endométrio, a partir do início da janela de implantação (dias 19-20 do ciclo menstrual), devido à perda do efeito protetivo do Bcl-2. Contrariamente, no compartimento estromal, um aumento da expressão do Bcl-2 tem sido associado a uma segunda onda de proliferação a partir do meio da fase lútea (von Rango *et al.*, 1998). Além disso, a administração da progesterona a mulheres na fase secretora tardia resulta na redução da apoptose, enquanto sua retirada desencadeia a apoptose e o desabamento endometrial (Reis *et al.*, 2013).

De acordo com os achados do presente trabalho, seria razoável supor uma possível participação da ativina A no processo acima descrito.

Orquestrada pela progesterona, a expressão crescente da ativina A nas células estromais do endométrio, do meio até o fim da fase secretora do ciclo menstrual, poderia estimular a redução da taxa de apoptose neste compartimento. Pode-se, inclusive, especular que, ao diminuir a apoptose nas HESC, a ativina A agiria na manutenção da integridade endometrial durante a janela de implantação, contribuindo para a receptividade embrionária. Este mecanismo potencial traz à tona uma nova hipótese para explicar as altas concentrações de ativina A previamente encontradas no lavado uterino de mulheres que engravidaram após inseminação intrauterina, comparadas com aquelas que não conseguiram engravidar (Florio *et al.*, 2010b).

Curiosamente, o presente estudo falhou em demonstrar uma correlação entre o tratamento das HESC com ativina A, associada ou não à folistatina, e a expressão de alguns dos genes reguladores da via intrínseca da apoptose (Bcl-2, Bax, caspase-3 e caspase-8). Talvez esses resultados se devam ao fato de terem sido analisados apenas os RNA mensageiros (RNAm) e não as respectivas proteínas, bem como a sua ativação (fosforilação), e em apenas um tempo do experimento (24 horas). Essa lacuna poderá ser preenchida através de novos estudos, com a replicação dos experimentos em diferentes tempos de estimulação hormonal e o estudo pormenorizado das proteínas sinalizadoras, para que se possa identificar a existência ou não de uma participação da ativina A como moduladora da via intrínseca da apoptose, previamente identificada no endométrio (von Rango *et al.*, 1998).

Dados da literatura mostram a ocorrência de expressão aberrante da ativina A em casos de abortamento recorrente, gravidez ectópica, sangramento anovulatório e endometriose, reforçando seu papel no estabelecimento da gravidez (Rombauts *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2007; Florio *et al.*, 2010a; Florio *et al.*, 2011). Reis *et al.* encontraram baixas concentrações de ativina A no fluxo menstrual de mulheres com sangramento uterino anormal, o que poderia refletir uma decidualização endometrial incompleta ou ausente (Reis *et al.*, 2007). Diante disso, seria plausível supor um possível papel da ativina A na prevenção do sangramento uterino. Estudos adicionais são necessários para testar esta hipótese, e com base nos presentes resultados, é válido considerar a prevenção da apoptose pela ativina A como um possível mecanismo de melhora da estabilidade endometrial.

Evidências prévias têm mostrado uma associação da ativina A à invasividade endometrial e sugerido sua participação na histogênese da endometriose. Ferreira *et al.* demonstraram que a ativina A estimula a invasão transmesotelial tanto das células epiteliais como das células estromais em um modelo de peritônio *in vitro* (Ferreira *et al.*, 2008). Os resultados do presente estudo parecem estar de acordo com tais achados, já que um possível papel da ativina A na redução da apoptose poderia facilitar a implantação ectópica de tecido endometrial. Para a confirmação desta hipótese, faz-se necessária a realização de trabalhos nos quais seja avaliado o efeito da ativina A sobre a apoptose em mulheres com endometriose.

Neste estudo, a ativina A foi capaz de inibir a liberação do TNF pelas HESC e este efeito foi anulado pela folistatina. No entanto, as concentrações de TNF encontradas nos meios de cultivo não puderam ser correlacionadas ao grau de apoptose identificado nas respectivas culturas celulares, sugerindo que a via extrínseca deflagrada pelo TNF não deva ser o principal alvo da ativina A na cascata apoptótica das HESC, pelo menos nas condições experimentais aqui reportadas.

Até o momento, não se tem conhecimento de outros estudos, na literatura, que tenham avaliado o efeito da ativina A ou da folistatina em relação à apoptose em células endometriais. As principais vantagens do desenho do presente estudo compreendem o uso de culturas primárias obtidas a partir de diversas pacientes e, portanto, de diferentes origens genéticas, o que torna os resultados mais generalizados se comparados a linhas celulares padrão, e o uso de métodos diretos e quantitativos para acessar a apoptose.

Por outro lado, investigação adicional se faz necessária para expandir os conhecimentos ora obtidos, já que o presente trabalho também apresentou algumas limitações. Foram realizados apenas experimentos *in vitro*, utilizando exclusivamente células estromais do endométrio que foram obtidas de doadoras saudáveis. Seria especialmente interessante, realizar a replicação dos experimentos utilizando células epiteliais, com o objetivo de comparar o papel da ativina A nos diferentes compartimentos endometriais. Ademais, o estudo de células provenientes de pacientes com endometriose seria certamente enriquecedor, levando a uma melhor compreensão desta doença.

## VI- CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a ativina A é capaz de modular a apoptose e promover a sobrevivência de células estromais do endométrio humano cultivadas *in vitro*.

Além disso, confirmou-se o papel da folistatina como antagonista da ativina A nas culturas de HESC, uma vez que a mesma foi capaz de reverter a inibição à apoptose promovida pela ativina A.

Apesar de a ativina A ter sido capaz de gerar uma diminuição nas concentrações de TNF liberadas nos meios de cultura das HESC, é provável que a via extrínseca da apoptose, deflagrada pelo TNF, não seja o principal mecanismo envolvido na regulação da apoptose pela ativina A nas HESC.

Não foi identificado o envolvimento de alguns dos genes participantes das vias intrínseca e extrínseca da apoptose (Bcl-2, Bax, caspase-3 e caspase-8) na promoção da sobrevivência das HESC pela ativina A.

Sumariamente, os resultados mostram uma possível ação protetora da ativina A em relação à apoptose no estroma endometrial humano. Os mecanismos regulatórios envolvidos no processo e a real implicação clínica dos presentes achados, todavia, continuam obscuros, fazendo-se necessário a realização de estudos adicionais.

## VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁICAS

Agic, A, Djalali S, Diedrich K, Hornung D. Apoptosis in endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 2009;68(4):217-223.

Anazetti MC, Melo PS. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp Pesquisa* 2007 Jan/Jun.;1(1):37-58.

Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: A review. *Clin Cancer Res* 2005;11:3155-3162.

Chen YG, Wang Q, Lin SL, Chang CD, Chung J, Ying SY. Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Experimental Biology and Medicine* 2006 May;231:534–544.

Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Methods* 2002;265 49-72.

Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in Cell Necrobiology: Analysis of Apoptosis and Accidental Cell Death (Necrosis). *Cytometry* 1997;27:1-20.

Ethier JF, Findlay JK. Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. *Reproduction* 2001;121:667-675.

Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2005;37(11):719–727.

Ferreira MC, Witz CA, Hammes LS, Kirma N, Petraglia F, Schenken RS, Reis FM. Activin A increases invasiveness of endometrial cells in an in vitro model of human peritoneum. *Molecular Human Reproduction* 2008;14(5):301–307.

Florio P, Severi FM, Luisi S, Ciarmela P, Calonaci G, Cobellis L, Petraglia F. Endometrial expression and secretion of activin A, but not follistatin, increase in the secretive phase of the menstrual cycle. *J Soc Gynecol Investig* 2003 May;10(4):237-243.

Florio P, Rossi M, Viganò P, Luisi S, Torricelli M, Torres PB, Di Blasio AM, Petraglia F. Interleukin 1beta and progesterone stimulate activin A expression and secretion from cultured human endometrial stromal cells. *Reprod Sci* 2007 Jan;14(1):29-36.

Florio P, Reis FM, Torres PB, Calonaci F, Abrao MS, Nascimento LL, Franchini M, Cianferoni L, Petraglia F. High serum follistatin levels in women with ovarian endometriosis. *Human Reproduction* 2009;24(10):2600–2606.

Florio P, Gabbanini M, Borges LE, Bonaccorsi L, Pinzauti S, Reis FM, Boy Torres P, Rago G, Litta P, Petraglia F. Activins and related proteins in the establishment of pregnancy. *Reprod Sci* 2010a April;17(4):320-330.

Florio P, Bruni L, Galleri L, Reis FM., Borges LE, Bocchi C, Litta P, De Leo, Petraglia F. Evaluation of endometrial activin A secretion for prediction of pregnancy after intrauterine insemination. *Fertility and Sterility* 2010b May 1; 93(7):2316-2320.

Florio P, Reis FM, Battista R, et al. Serum activin A levels are lower in tubal than intrauterine spontaneously conceived pregnancies. *Gynecol Endocrinol* 2011;27:391-5.

Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev* 2014;35:851-905.

Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16 (6):2129-2144.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte Celular por Apoptose (Apoptosis: Programmed Cell Death). *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007;53(3):335-343.

He ZY, Liu HC, Mele CA, Barmat L, Veeck LL, Davis O, Rosenwaks Z. Expression of inhibin/activin subunits and their receptors and binding proteins in human preimplantation embryos. *J Assist Reprod Genet* 1999;16:73-80.

Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. The apoptosis cascade — morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol* 1999;200:1-18.

Jones RL, Salamonsen LA, Findlay JK. Activin A promotes human endometrial stromal cell decidualization in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2002a Aug; 87(8): 4001-4004.

Jones RL, Salamonsen LA, Zhao YC, Ethier JF, Drummond AE, Findlay JK. Expression of activin receptors, follistatin and betaglycan by human endometrial stromal cells; consistent with a role for activins during decidualization. *Mol Hum Reprod*. 2002b Apr;8(4):363-74.

Jones RL, Salamonsen LA, Findlay JK. Potential roles for endometrial inhibins, activins and follistatin during human embryo implantation and early pregnancy. *Trends Endocrinol Metab* 2002c;13:144-150.

Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction* 2006 Aug;132(2): 217-232.

Kaitu'u-Lino TJ, Phillips DJ, Morison NB, Salamonsen LA. A new role for activin in endometrial repair after menses. *Endocrinology* 2009 April;150(4):1904-1911.

Kelly RW, King AE, Critchley HOD. Cytokine control in human endometrium. *Reproduction* 2001;121:3-19.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1976;26:239- 257.

Kroemer G, Martin SJ. Caspase-independent cell death. *Nat Med* 2005;11:725-730.

Leist M, Jaatela M. Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:589-598.

Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: An innocent convict? *J Clin Invest* 2005;115:2679-2688.

Ling N, Ying SY, Ueno H, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the  $\beta$  subunits of the two forms of inhibin. *Nature* 1986;321:779-782.

Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 1997;89:175-184.

Lopes IMRS, Baracat MCP, Simões MJ, Simões RS, Baracat EC, Soares Jr JM. Endométrio na janela de implantação em mulheres com síndrome dos ovários policísticos. Rev Assoc Med Bras 2011;57(6):702-709.

Mangioni S, Viganò P, Florio P, Borghi O, Vignali M, Petraglia F, Di Blasio AM. Effect of activin A on tumor necrosis factor-alpha/intercellular adhesion molecule-1 pathway in endometrial stromal cells. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2005 Dec 1;123(2):218-223.

Mcconkey, DJ. Cellular signaling in cell death. New Horiz 1993 Feb;1(1):52-59.

Mignotte B, Vayssiere JL .Mitochondria and apoptosis. Eur J Biochem. 1998;252(1)1-15.

Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. Science 1990;247:836–838.

Palma PR. Avaliação da anexina V e calceína AM como marcadores de apoptose em linfócitos (dissertação). Universidade Federal de Santa Catarina; 2005. 91 p.

Petit PX, Zamzami N, Vayssièrè JL, Mignotte B, Kroemer G, Castedo M. Implication of mitochondria in apoptosis. Mol Cell Biochem 1997 Sep;174(1-2):185-188.

Refaat B. Role of activins in embryo implantation and diagnosis of ectopic pregnancy: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2014 Nov 25;12:116.

Reis FM, Nascimento LL, Tsigkou A, Ferreira MC, Luisi S, Petraglia F. Activin A and follistatin in menstrual blood: low concentrations in women with dysfunctional uterine bleeding. *Reprod Sci* 2007;14:383-389.

Reis FM, Luisi S, Abrão MS, Rocha ALL, Viganò P, Rezende CP, Florio P, Petraglia F. Diagnostic value of serum activin A and follistatin levels in women with peritoneal, ovarian and deep infiltrating endometriosis. *Human Reproduction* 2012; 27(5):1445-1450.

Reis FM, Petraglia F, Taylor RN. Endometriosis: hormone regulation and clinical consequences of chemotaxis and apoptosis. *Human Reproduction Update* 2013;19(4):406-418.

Rocha ALL, Carrarelli P, Novembri R, Sabbioni L, Luisi S, Reis FM, Petraglia F. Altered expression of activin, cripto, and follistatin in the endometrium of women with endometrioma. *Fertility and Sterility* 2011 June;95(7):2241-2246.

Rocha ALL, Carrarelli P, Novembri R, et al. Activin A stimulates interleukin 8 and vascular endothelial growth factor release from cultured human endometrial stromal cells: possible implications for the pathogenesis of endometriosis. *Reprod Sci* 2012;19:832-838.

Rombauts L, Donoghue J, Cann L, Jones RL, Healy DL. Activin A secretion is increased in the eutopic endometrium from women with endometriosis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006;46:148-153.

Rupnarain C, Dlamini Z, Naicker S, Bhoola K. Colon cancer: genomics and apoptotic events. *Biol Chem*. 2004 Jun;385(6):449-464.

Shen HM, Pervaiz S. TNF receptor superfamily-induced cell death: redoxdependent execution. *The FASEB Journal* 2006; 20(10):1589-1598.

Souza MIL, Velásquez LFU. O Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) na Reprodução de Fêmeas - Revisão de Literatura. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar, Umuarama* 2008 Jan/Jun;11(1):47-53.

Strasser A, Cory S, Adams JM. Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *The EMBO Journal* 2011;30(18):3667-3683.

Tabibzadeh S. The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodeling. *Molecular Human Reproduction* 1996;2(2):77-92.

Thornberry NA. The caspase family of cysteine proteases. *British Medical Bulletin* 1997;53(3):478-490.

Torres PB, Florio P, Ferreira MC, Torricelli M, Reis FM, Petraglia F. Deranged expression of follistatin and follistatin-like protein in women with ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 2007;88:200–205.

Vale W, Rivier J, Vaughan J, McClintock R, Corrigan A, Woo W, Karr D, Spiess J. Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine follicular fluid. *Nature* 1986;321:776-779.

Vale WW, Bilezikjian LM. Local Extragonadal Roles of Activins. *Trends Endocrinol Metab* 1992;3:218-223.

Vaskivuo TE, Stenbäck F, Tapanainen JS. Apoptosis and apoptosis-related factors Bcl-2, Bax, tumor necrosis factor-alpha, and NF-kappaB in human endometrial hyperplasia and carcinoma. *Cancer* 2002 Oct 1;95(7):1463-1471.

von Rango U, Classen-Linke I, Krusche CA, Beier HM. The receptive endometrium is characterized by apoptosis in the glands. *Hum Reprod* 1998;13:3177-3189.

Williams JR, Little JB, Shipley WU. Association of mammalian cell death with specific endonucleolytic degradation of DNA. *Nature* 1974;252:754-756.

Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Cytometry in Cell Necrobiology Revisited. *Recent Advances and New Vistas. Cytometry Part A* 2010;77A:591-606.

Woodruff TK, Mather JP. Inhibin, activin and the female reproductive axis. *Annu Rev Physiol* 1995;57:219-244.

Wu CC, Bratton SB. Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal* 2013 Aug 20;19(6):546-58.