

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

CYNTHIA DELA CRUZ DE FREITAS

**ESTUDO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO NODAL NO ENDOMÉTRIO E  
NA FISIOPATOLOGIA DA ENDOMETRIOSE**

BELO HORIZONTE - MG

AGOSTO - 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

CYNTHIA DELA CRUZ DE FREITAS

**ESTUDO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO NODAL NO ENDOMÉTRIO E  
NA FISIOPATOLOGIA DA ENDOMETRIOSE**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do grau de Doutor(a) em Ciências Biológicas – Farmacologia.

**Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Fernando Marcos dos Reis**

BELO HORIZONTE - MG

AGOSTO - 2013

**Dedico este trabalho ao meu marido, Rafael, por muitas vezes ter sido o meu ponto de equilíbrio, e por ter me apoiado em todas as etapas que passei durante esses quatro anos de estudo.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde e determinação, para conduzir este trabalho.

Ao meu orientador, Professor Fernando, por ter aceitado a orientar este estudo, e por dividir comigo todo o seu conhecimento científico.

A minha mãe, Eliane, e minhas irmãs, Carmen e Carol, pelo apoio, incentivo e momentos de descontração.

A minha irmã-afilhada, Vitória, por me fazer acreditar que sempre podemos superar qualquer tipo de dificuldade.

A Tia Esmeralda, pelo apoio, incentivo e por sempre acreditar em mim.

Aos meus avós, Leontina e José Pedro, pelo apoio e amor de sempre.

A Professora Adelina Martha dos Reis por ter me recebido em seu laboratório.

Aos Professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia por dividirem seus conhecimentos em cada disciplina ministrada.

Aos colegas de laboratório do ICB, Fernanda, Carina, Kinulpe, Luciana, Mauro, Fernandinha, Lucas, Daniel, Laura, Gisele, Janine, Patrícia, Juliana e Daniela.

As pacientes que foram voluntárias neste estudo.

Aos médicos, residentes e ex-residentes do Laboratório de Reprodução Humana, especialmente a Dra. Ines, Dr. Francisco e Dra. Júnia, que sempre foram muito prestativos em fazer as coletas das amostras para este estudo.

A Helen, Ana Flávia e Maíra pela ajuda e apoio técnico nos experimentos de PCR.

A Ana Flávia e Júlia pela ajuda na coleta das amostras.

Aos colegas do Laboratório de Reprodução Humana, Verônica, Maria das Graças, Simone, Marco Aurélio, Rubens, Juliana e Flávia.

Ao Dr. Milan Bagchi por me receber e me co-orientar na University of Illinois.

Aos colegas da School of Molecular and Cellular Biology, Janelle, Sandeep, Alisson, Yechao, Beth e em especial Hatice por dividir comigo toda a sua experiência em cultivo celular.

Aos amigos Flaviane, Rafael, Camila, Adelmo, Nina, Rodrigo, aos meus cunhados Décio e Talita pelos momentos divertidos e de descontração, que foram essenciais para que esta etapa fosse concluída.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Reprodução Humana, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Parte dos experimentos foram realizados na University of Illinois – The School of Molecular and Cellular Biology, em Urbana-Champaign, IL, USA, sob orientação do Dr. Milan K Bagchi, durante o período de doutorado sanduíche. O trabalho foi realizado sob o auxílio concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Hormônios e Saúde da Mulher (INCT).

# SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE GRÁFICOS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	01
1.1 A FAMÍLIA TGF-BETA.....	01
1.1.1 MEMBROS.....	01
1.1.2 NODAL.....	03
1.2 O ENDOMÉTRIO E A VIA NODAL-CRIPTO.....	07
1.2.1 O CICLO MENSTRUAL E A VIA NODAL-CRIPTO.....	07
1.2.2 DECIDUALIZAÇÃO.....	09
1.3 ENDOMETRIOSE.....	11
1.3.1 ENDOMETRIOSE E INFERTILIDADE.....	13
1.3.2 ENDOMETRIOSE E A VIA NODAL-CRIPTO.....	15
2 JUSTIFICATIVA.....	17
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 OBJETIVO GERAL.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4 METODOLOGIA.....	19
4.1 EXPERIMENTOS “ <i>IN VITRO</i> ”.....	19
4.1.1 CULTIVO DE CÉLULAS ESTROMAIS ENDOMETRIAIS HUMANAS.....	19
4.1.2 ESTÍMULO HORMONAL AGUDO.....	19
4.1.3 DECIDUALIZAÇÃO.....	20
4.1.4 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE CDNA E PCR EM TEMPO REAL...20	
4.1.5 WESTERN BLOT.....	21

4.2 ESTUDO DE BIÓPSIAS ENDOMETRIAIS DE MULHERES COM E SEM ENDOMETRIOSE.....	23
4.2.1 PACIENTES.....	23
4.2.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	24
4.2.3 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE CDNA E PCR EM TEMPO REAL...24	
4.2.4 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	26
4.2.4.1 INCLUSÃO E CORTE.....	26
4.2.4.2 PROTOCOLO.....	26
4.2.4.3 AVALIAÇÃO DAS LÂMINAS.....	26
4.2.5 WESTERN BLOT.....	27
4.2.5.1 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	27
4.2.5.2 ELETROFORESE.....	27
4.2.5.3 TRANSFERÊNCIA.....	28
4.2.5.4 PROTOCOLO.....	28
4.2.5.5 REVELAÇÃO.....	28
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
5 RESULTADOS.....	30
5.1 EXPERIMENTOS “ <i>IN VITRO</i> ”.....	30
5.2 CULTIVO DE CÉLULAS ESTROMAIS ENDOMETRIAIS HUMANAS.....	30
5.3 ESTÍMULO HORMONAL AGUDO.....	31
5.4 DECIDUALIZAÇÃO.....	35
5.5 EXPERIMENTO “ <i>IN SITU</i> ”.....	39
6 DISCUSSÃO.....	52
7 CONCLUSÕES.....	60
8 REFERÊNCIAS.....	61



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Oligonucleotídeos *primers* para a reação de PCR em tempo real dos genes-alvo do 36B4, IGFBP-1, Prolactina, Nodal, Cripto, Smad 4 e Smad 7.....21

**Tabela 2** - Oligonucleotídeos *primers* para a reação de PCR em tempo real dos genes-alvo do S26, Nodal, Cripto, Smad 3 e Smad 4.....25

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mecanismo de transdução de sinal do Nodal independente do Cripto.....	04
<b>Figura 2</b> - Mecanismos de transdução de sinal do Nodal dependente do Cripto.....	06
<b>Figura 3</b> - Marcação imunofluorescente para células estromais endometriais.....	30
<b>Figura 4</b> - Expressão proteica do Nodal em células estromais endometriais, tratadas ou não com E <sub>2</sub> , P <sub>4</sub> , E <sub>2</sub> +P <sub>4</sub> e E <sub>2</sub> +P <sub>4</sub> +cAMP por 24 horas.....	33
<b>Figura 5</b> - Alterações morfológicas das células estromais endometriais durante o tratamento de 8 dias com E <sub>2</sub> +P <sub>4</sub> + cAMP.....	36
<b>Figura 6</b> - Expressão proteica do Nodal em células estromais endometriais, tratadas ou não com o coquetel de decidualização por 8 dias.....	38
<b>Figura 7</b> - Expressão proteica do Nodal no endométrio eutópico do grupo controle e no endométrio eutópico de mulheres com endometriose.....	41
<b>Figura 8</b> - Expressão proteica do Cripto no endométrio eutópico do grupo controle e no endométrio eutópico de mulheres com endometriose.....	43
<b>Figura 9</b> - Imunoreatividade da Smad 3 no endométrio eutópico do grupo controle, no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e no controle negativo.....	45
<b>Figura 10</b> - Imunoreatividade da Smad 3 fosforilada no endométrio eutópico do grupo controle, no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e controle negativo.....	47
<b>Figura 11</b> - Imunoreatividade da Smad 4 no endométrio eutópico do grupo controle, no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e no controle negativo.....	50

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Expressão gênica do Nodal durante o tratamento com Estrógeno, Progesterona, Estrógeno + Progesterona e Estrógeno + Progesterona + cAMP por 24 horas.....	31
<b>Gráfico 2</b> - Expressão gênica do Cripto durante o tratamento com Estrógeno, Progesterona, Estrógeno + Progesterona e Estrógeno + Progesterona + cAMP por 24 horas.....	32
<b>Gráfico 3</b> - Expressão gênica da Smad 4 durante o tratamento com Estrógeno, Progesterona, Estrógeno + Progesterona e Estrógeno + Progesterona + cAMP por 24 horas.....	34
<b>Gráfico 4</b> - Expressão gênica da Smad 7 durante o tratamento com Estrógeno, Progesterona, Estrógeno + Progesterona e Estrógeno + Progesterona + cAMP por 24 horas.....	35
<b>Gráfico 5</b> - Expressão gênica da Prolactina e IGFBP-1 durante o processo de decidualização.....	37
<b>Gráfico 6</b> - Expressão gênica do Nodal durante o processo de decidualização “ <i>in vivo</i> ”.....	37
<b>Gráfico 7</b> - Expressão gênica do Cripto durante o processo de decidualização “ <i>in vivo</i> ”.....	39
<b>Gráfico 8</b> - Expressão gênica do Nodal no endométrio eutópico do grupo controle (sem endometriose) e no grupo endometriose.....	40
<b>Gráfico 9</b> - Expressão gênica do Cripto no endométrio eutópico do grupo controle (sem endometriose) e no grupo endometriose.....	42
<b>Gráfico 10</b> - Expressão gênica da Smad 3 no endométrio eutópico do grupo controle (sem endometriose) e no grupo endometriose.....	44
<b>Gráfico 11</b> - Score de imunomarcção da Smad 3 no endométrio eutópico do grupo controle (sem endometriose) e no grupo endometriose.....	46
<b>Gráfico 12</b> - Score de imunomarcção da Smad 3 fosforilada no endométrio eutópico do grupo controle (sem endometriose) e no grupo endometriose.....	48
<b>Gráfico 13</b> - Expressão gênica da Smad 4 no endométrio eutópico do grupo controle (sem endometriose) e no grupo endometriose.....	49

**Gráfico 14** - Porcentagem de marcação nuclear da Smad 4 no endométrio eutópico do grupo controle (sem endometriose) e no grupo endometriose.....51

## LISTA DE ABREVIATURAS

AEBSF - benzenesulfonyl fluoride hydrochloride  
AMH - Hormônio Anti-Mulleriano  
BMP - Proteína Morfogenética do Osso  
cAMP - 8-Bromoadenosina 3',5' – monofosfato cíclico  
CDMP - Proteína Morfogênica Derivada da Cartilagem  
csFCS – Soro fetal bovino filtrado com carvão ativado  
DAB – Diaminobenzamina  
DMEM - Dulbecco's *modified Eagle's medium*  
E<sub>2</sub> - 17-β Estradiol  
E-64 – epóxido  
EDTA - Ethylenediamine Tetraacetic Acid  
EGF – Fator de Crescimento Epidermal  
ELISA – Ensaio imunoenzimático  
FSH – Hormônio Folículo Estimulante  
GDF - Fator de crescimento e diferenciação  
GPI – Glicosil-fosfatidil-inositol  
HCl – Ácido Clorídrico  
hESCs – Células Endometriais Estromais Humanas  
IGFPB – Proteína Ligadora do Fator de Crescimento semelhante à Insulina  
IHQ - Imunohistoquímica  
NaCl – Cloreto de Sódio  
P<sub>4</sub> – Progesterona  
PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida  
PBS – Tampão salina-fosfato  
PCR – Reação em Cadeia de Polimerase  
PMSF - phenylmethylsulfonyl fluoride  
PREs – Elementos Responsivos a Progesterona  
PRL – Prolactina  
SDS – Sulfato Dodecil de Sódio  
TBS – Tampão Tris Salina

TF – Fator Tecidual

TGF-beta - Fatores de Crescimento Transformadores – beta

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

## RESUMO

No presente estudo, investigamos o papel do Nodal, membro da família TGF-beta, e de proteínas relacionadas ao seu mecanismo de transdução de sinal, em células endometriais estromais estimuladas ou não, com Estrógeno (10nM), Progesterona (1µM), Estrógeno (10nM) + Progesterona (1µM) e Estrógeno (10nM) +Progesterona (1µM) + AMPc (0.5mM) por 24 horas e durante o processo de decidualização (Estrógeno+Progesterona+AMPc) por 8 dias. Avaliamos também a expressão dessas proteínas no endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose. O estímulo hormonal esteroide aumentou a expressão proteica de Nodal e a expressão gênica da Smad 4 e da Smad 7, sugerindo que a via de transdução do Nodal está ativada. O aumento encontrado na expressão gênica da Smad 4 e da Smad 7, mesmo apresentando ações biológicas opostas, indica que esse sistema possuiu um mecanismo de feedback que regula as ações Nodal nas células estromais sob ação dos hormônios esteroides. A expressão gênica de Cripto foi diminuída durante o processo de decidualização das células endometriais estromais “*in vitro*”, sugerindo que nesse processo ele age como um antagonista das ações da ativina. No endométrio eutópico de mulheres com endometriose encontramos uma diminuição na expressão gênica de Cripto e na imunorreatividade da Smad 3. Os resultados obtidos sugerem que o desequilíbrio observado na expressão gênica de Cripto pode ter sido o responsável pela menor expressão da Smad 3 no endométrio eutópico das mulheres com endometriose. Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que a via de sinalização do Nodal apresenta alterações sutis no endométrio de mulheres com endometriose, que não determinam desequilíbrio na sinalização final (Smad 4) mas podem ter outras consequências funcionais, além de constituir potenciais alvos farmacológicos.

## ABSTRACT

In the present study we investigated the role of Nodal, member of the TGF-beta family, and proteins related to their mechanism of signal transduction in endometrial stromal cells stimulated or not with Estrogen (10 nM), Progesterone (1 $\mu$ M), Estrogen (10nM) + Progesterone (1 $\mu$ M) and Estrogen (10nM) + Progesterone (1 $\mu$ M) + cAMP (0.5mM) for 24 hours and during the process of decidualization (Estrogen + Progesterone + cAMP) for 8 days. We also evaluated the expression of these proteins in eutopic endometrium of women with and without endometriosis. The steroid hormone stimulation increased the expression of Nodal protein and gene expression of Smad 4 and Smad 7, suggesting that transduction of Nodal is activated. The increase found in the gene expression of Smad 4 and Smad 7, even with opposing biological actions, indicates that this system possessed a feedback mechanism that regulates the actions Nodal in stromal cells under the action of steroid hormones. The gene expression of Cripto was decreased during the process of decidualization of endometrial stromal cells "in vitro", suggesting that in this case it acts as an antagonist of the actions of Activin. In eutopic endometrium of women with endometriosis we found a decrease in the gene expression of Cripto and in immunoreactivity of Smad 3. These results suggest that the imbalance observed in gene expression of Cripto may have been responsible for the lower protein expression of Smad 3 in eutopic endometrium of women with endometriosis. Together, the results suggest that the Nodal signaling pathway has subtle changes in the endometrium of women with endometriosis, which do not determine imbalance in the end of the signaling (Smad 4) but may have other functional consequences, as well as being potential pharmacological targets.



## 1.0) Revisão de Literatura

### 1.1) A família TGF-beta

#### 1.1.1) Membros

As citocinas pertencentes à família TGF-beta são proteínas diméricas, com estruturas conservadas e desempenham ações pleiotrópicas tanto “*in vivo*” quanto “*in vitro*”, o que significa que possuem a capacidade de atuar sobre tipos celulares diferentes (Ethier e Findlay, 2001). Pertencem a essa família mais de 30 tipos de citocinas, que estão divididas em dois grupos, de acordo com o seu mecanismo de ação:

- a) TGF- $\beta$ s/Ativinas/Inibinas/Nodal/Cripto;
- b) Proteína Morfogenética do Osso - BMP/Fator de crescimento e diferenciação - GDF/Hormônio Anti-Mulleriano - AMH (Miyazawa *et al.*, 2002; Liu e Feng, 2010).

Membros da família TGF-beta podem agir na proliferação celular, diferenciação e apoptose (Miyazawa *et al.*, 2002; Shi e Massague, 2003; Massague e Gomis, 2006; Kang, Liu e Derynck, 2009; Liu e Feng, 2010), podendo assim apresentar ações biológicas diferentes e até mesmo opostas, dependendo das condições e dos tipos celulares em que eles atuarem (Massague, 2012).

Os Fatores de Crescimento e Transformadores - beta (Harrison *et al.*, 2005) são os protótipos dessa grande família (Wrana, 2000) e agem como potentes inibidores do crescimento de vários tipos celulares, além de induzirem a apoptose das células epiteliais (Miyazawa *et al.*, 2002). As Ativinas desempenham uma importante função na indução do mesoderma dorsal durante a embriogênese, estimulam a produção de FSH pela hipófise, bem como regulam o crescimento, diferenciação e apoptose das células epiteliais e hematopoiéticas (Miyazawa *et al.*, 2002; Harrison *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2012). Já as Inibinas, são citocinas conhecidas por inibirem a produção de FSH pela hipófise, agindo assim como antagonistas das Ativinas (Phillips e Woodruff, 2004; Zhu *et al.*, 2012). A expressão do Nodal está relativamente restrita ao início da indução do mesoderma dorsal, padrão anterior e formação da assimetria do eixo direito-esquerdo do embrião, bem como aos tecidos

reprodutivos (Hendrix *et al.*, 2007). Não considerado um membro efetivo da família, o Cripto apresenta-se como um importante regulador da via da sinalização tanto do Nodal, por ser o seu co-receptor, quanto da Ativina, por ser capaz de inibir suas ações (Adkins *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2003; Harrison *et al.*, 2005).

As Proteínas Morfogenéticas dos Ossos (BMPs) são conhecidas por induzirem respostas quimioativas, proliferativas e de diferenciação que resultam na formação da cartilagem e tecido ósseo (Wagner *et al.*, 2010). A Miostatina, também conhecida como GDF-8 é produzida pelas células musculares e tem a função de inibir o seu crescimento. O GDF-5, também conhecido como proteína morfogênica derivada da cartilagem -1 (CDMP-1) é estruturalmente relacionado aos BMPs e induz a formação de cartilagens (Miyazawa *et al.*, 2002). O hormônio anti-mulleriano (AMH) é produzido pelas células de Sertoli no feto e induz a regressão das estruturas mullerianas durante a embriogênese no sexo masculino. Após o nascimento, esse hormônio é produzido pelas células da granulosa ovarianas e inibe enzimas esteroidogênicas gonadais (Pangas, 2012).

Embora os diversos membros da família TGF-beta desempenhem ações biológicas diferentes, o mecanismo de sinalização para todos eles é fundamentalmente o mesmo (Wakefield e Hill, 2013). A via de sinalização básica consiste de dois tipos de receptores de membrana serina/treonina/quinase e de uma família de transdutores de sinais citoplasmáticos (Smads), responsáveis pela regulação da transcrição de genes alvos da ação da família TGF-beta (Massague e Chen, 2000). Os receptores em questão são o TGF $\beta$ RI e TGF $\beta$ RII (Yeo e Whitman, 2001; Shen, 2007). O mecanismo de ativação envolve inicialmente o receptor do tipo II, o qual leva ao recrutamento, fosforilação e ativação do receptor do tipo I (Schier e Shen, 2000; Wrana e Attisano, 2000). Uma vez ativado, o receptor TGF $\beta$ RI traduz e fosforila substratos intracelulares determinando assim, a especificidade dos sinais a serem induzidos pelo ligante (Miyazawa *et al.*, 2002), através das Smads.

As Smads são proteínas mediadoras da sinalização de todos os membros da família TGF-beta (Byfield e Roberts, 2004; Ten Dijke e Hill, 2004). Esse grupo de proteínas é dividido em três subclasses:

- a) R-Smads: Smads reguladas pelos receptores;
- b) Co-Smad: Smad mediadora comum. Para todos os membros da família TGF-beta é a Smad 4;
- c) I-Smads: Smads inibitórias (Wrana, 2000; Wrana e Attisano, 2000; Liu e Feng, 2010).

As Smads são quimicamente compostas por um domínio N-terminal (MH-1), por uma região de ligação e por um domínio C-terminal (MH-2). O domínio MH-2 é conservado nas três classes das Smads, enquanto o domínio MH-1 é conservado nas R-Smads e na Co-Smad (Miyazawa *et al.*, 2002; Liu e Feng, 2010). Como consequência da fosforilação do TGF $\beta$ RI, as R-Smads, sofrem fosforilação, que então recrutam a Co-Smad, que é translocada para o núcleo da célula, onde irá regular a expressão de genes alvo através da ligação direta a região promotora do gene (Liu e Feng, 2010). Por outro lado, as I - Smads podem agir através do mecanismo de feedback, inibindo a fosforilação das R-Smads, evitando assim a formação do complexo R-Smads-Co-Smads (Valdimarsdottir *et al.*, 2006; Moustakas e Heldin, 2009). Apesar das Smads serem conhecidas como a via canônica do mecanismo de ação dos membros da família TGF-beta, estudos tem mostrado que esses ligantes podem também ser regulados através da ativação de outras moléculas sinalizadoras (Hoover e Kubalak, 2008).

#### 1.1.2) Nodal

O Nodal é uma proteína homodimérica de 220 aminoácidos (Calvanese *et al.*, 2010), essencial para a indução do mesoderma e endoderma, para o padrão de formação do eixo direito-esquerdo e outros importantes eventos da embriogênese (Brennan, Norris e Robertson, 2002; Nonaka *et al.*, 2002; Calvanese *et al.*, 2010; Quail *et al.*, 2013). Neste sentido, estudos mostraram que a sua expressão é relativamente restrita ao embrião e às células reprodutivas, e não é detectável na maioria dos tecidos adultos saudáveis (Hendrix *et al.*, 2007; Wakefield e Hill, 2013).

Como outros membros da família TGF $\beta$ , o Nodal inicia sua sinalização através de dois tipos de receptores serina-treonina kinase, que são os

receptores do tipo I e tipo II da ativina (Harrison *et al.*, 2005; Tsuchida *et al.*, 2008). Uma vez que o Nodal se liga ao receptor tipo II da ativina (ActRIIA ou ActRIIB), o receptor tipo I (ALK7, conhecido também como ActRIC) é ativado e fosforilado e recruta as proteínas transdutoras de sinais Smads 2 e 3 (R-Smads). Quando essas proteínas formam um complexo Smad 2/3 e sofrem fosforilação, elas recrutam a Smad 4 que é então translocada para o núcleo para ativar a transcrição de genes alvos. (Kumar *et al.*, 2001; Shen, 2007; Schier, 2009) (Figura -1).

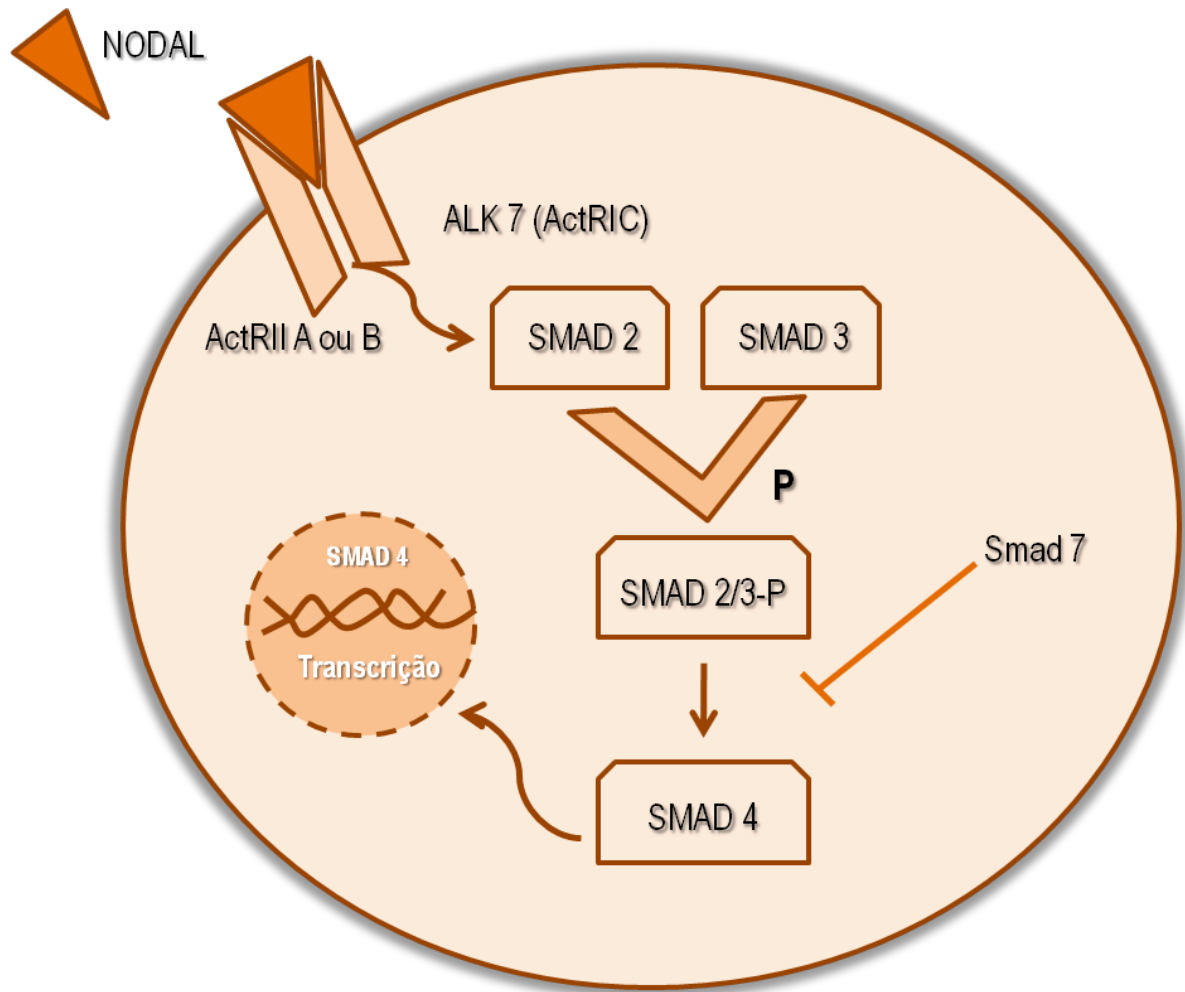


Figura 1 – Mecanismo de transdução de sinal do Nodal independente do Cripto

Uma segunda via de sinalização do Nodal, envolve o Cripto, que é um gene que codifica uma proteína de 188 aminoácidos, pertencente à família dos Fatores de Crescimento Epidermais – Cripto, FRL-1 e Cryptic (EGF-CFC) (Ciccodicola

*et al.*, 1989). Membros dessa família possuem um domínio N-terminal, dois domínios adjacentes ricos em cisteínas, e uma região hidrofóbica C-terminal ligada à membrana por um motif glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Shen, 2003). Por esse mecanismo de ação, o Nodal também irá se acoplar ao ActRIIA ou ActRIIB, no entanto o receptor tipo I a ser ativado será o do tipo ALK 4 (conhecido também como ActRIB), que irá recrutar o Cripto para a via de sinalização do Nodal, fazendo com ele se torne essencial para a sinalização (Yeo e Whitman, 2001; Shen, 2003; 2007; Quail *et al.*, 2013). A partir desse momento, as Smads 2 e 3 serão recrutadas, o complexo com a Smad 4 irá ser formado, a Smad 4 irá ser translocada para o núcleo onde ocorrerá a ativação da transcrição de genes alvos (Miyazawa *et al.*, 2002; Shi e Massague, 2003; Liu e Feng, 2010) (Figura – 2). Adicionalmente, estudos indicam que o Cripto pode ativar outras vias de sinalização nas células epiteliais de uma maneira Nodal-independente (Bianco *et al.*, 2002). Neste contexto, a sinalização do Nodal pode ser antagonizada por inibidores solúveis como o Lefty e Cerberus. O Lefty antagoniza o Nodal ao se ligar diretamente e interagir com ele, ou por se ligar no Cripto e impedir que o complexo Nodal- Cripto-ALK4 seja formado (Chen e Shen, 2004). Adicionalmente, o Lefty não se liga ao ALK 4 ou ao ActRIIA/B, indicando que essa proteína não se comporta como um antagonista competitivo do complexo de receptores ALKs (Strizzi *et al.*, 2009). Já o Cerberus, membro da família cisteína *knot*, inibe diretamente a sinalização do Nodal, impedindo que ele se ligue em seus respectivos receptores (Piccolo *et al.*, 1999; Belo *et al.*, 2009).

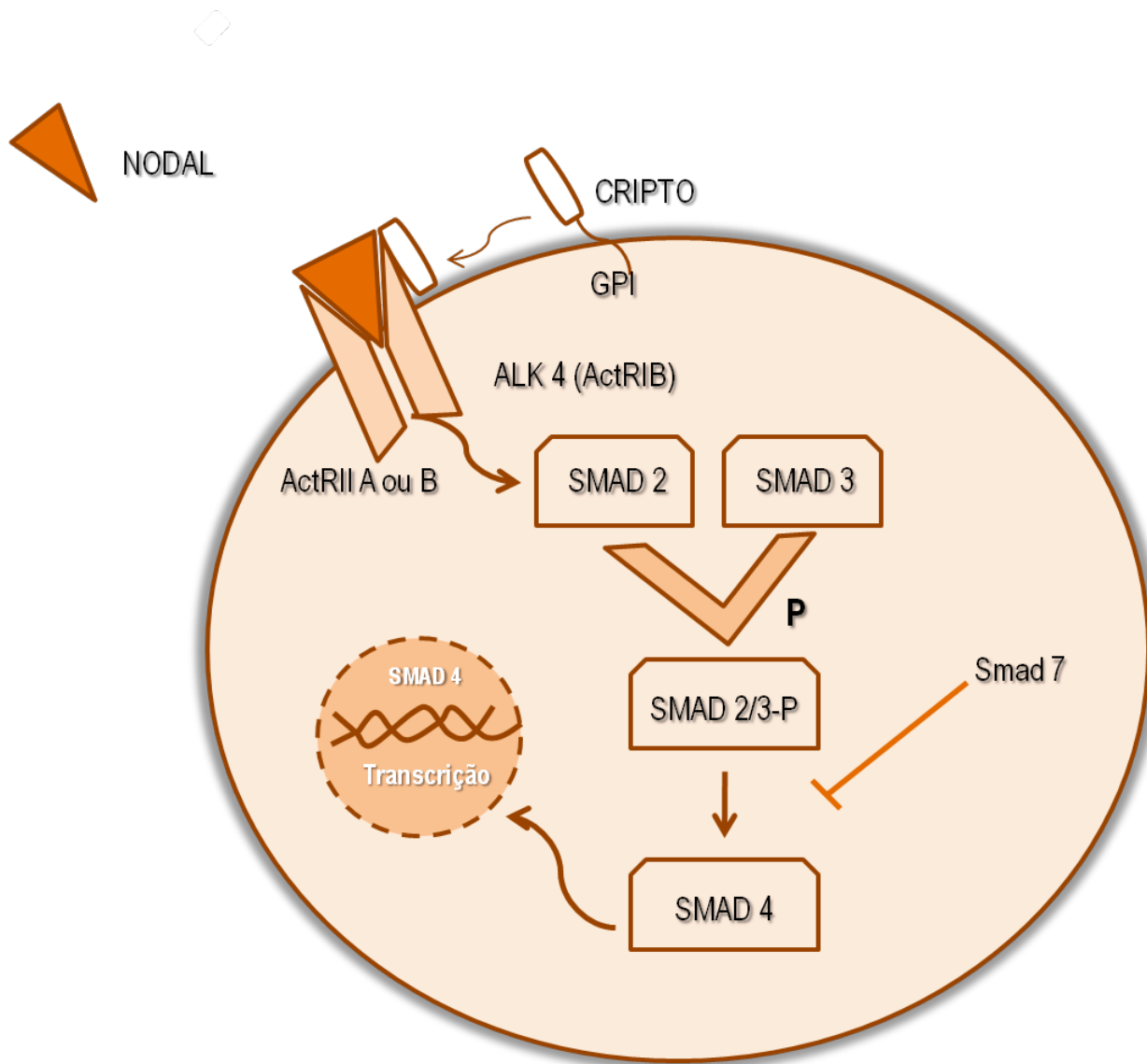


Figura 2 – Mecanismos de transdução de sinal do Nodal dependente do Cripto.

Inúmeras atividades biológicas ocorridas durante o início da embriogênese têm sido atribuídas ao Nodal, e com isso o papel da sua via de sinalização na indução do mesoderma e endoderma, no padrão de formação neuronal e na formação do eixo direito-esquerdo já estão bem estabelecidos (Shen, 2007), neste sentido, estudos recentes indicaram que a sinalização do Nodal é fundamental por manter as células embrionárias tanto de camundongos quanto de humanos no seu estado indiferenciado (Brandenberger *et al.*, 2004; Shen, 2007; Vallier *et al.*, 2009). Embora o Nodal e membros da sua via de sinalização não sejam normalmente

expressos no adulto, tecidos que sofrem remodelamento constantemente, como placenta, endométrio e glândula lactante mamária tem apresentado a sua expressão em ensaios bioquímicos (Quail *et al.*, 2013; Wakefield e Hill, 2013), e estudos nesses tecidos, tem correlacionado a expressão alterada de Nodal com a progressão de vários tipos de câncer (Wakefield e Roberts, 2002; Le Good *et al.*, 2005; Postovit *et al.*, 2007; Shen, 2007). Recentemente, pesquisadores avaliaram a expressão de mRNA para Ativina A, ActRIIA, Nodal e Cripto no endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose e concluíram que a expressão alterada de Ativina A e Cripto sugerem o envolvimento de membros da família TGF-beta nas alterações sofridas pelo endométrio eutópico de mulheres com endometriose (Torres *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2011). Nesse sentido, da mesma forma como ocorreu com as doenças malignas, em que a via Nodal-Cripto se tornou um alvo terapêutico atrativo (Rangel *et al.*, 2012; Wakefield e Hill, 2013), pelo fato do Nodal estar ausente na maioria dos tecidos adultos normais e o Cripto estar pouco expresso, também se tornou interessante avaliar o papel do Nodal e de proteínas relacionadas ao seu mecanismo de ação na fisiopatologia da endometriose, com o objetivo de entender melhor o mecanismo da doença e identificar um novo biomarcador e um possível alvo para intervenções farmacológicas para o tratamento dessa doença.

## 1.2) O Endométrio e a via Nodal-Cripto

### 1.2.1) Ciclo Menstrual e a via Nodal-Cripto

O ciclo menstrual é basicamente dividido em três fases influenciadas pelas alterações cíclicas dos hormônios esteroides: proliferativa, secretora e menstrual (Finn, 1998). Durante a fase proliferativa, o endométrio responde ao aumento dos níveis de estradiol por apresentar o epitélio mais funcional e espesso, as células estromais e endoteliais proliferativas, as glândulas mais finas, alongadas e tortuosas, o estroma se torna mais edematoso, e a árvore vascular mais desenvolvida (Battersby *et al.*, 2004; Henriët, Gaide Chevronnay e Marbaix, 2012). Durante a fase secretora, sob influência da progesterona produzida pelo corpo lúteo, as células estromais sofrem decidualização, um processo crucial para preparar o endométrio para a implantação do embrião. As células estromais deciduais se tornam arredondadas, ocorre um aumento

no citoplasma, elas adquirem características miofibroblásticas e começam a secretar uma variedade de proteínas específicas como a Prolactina (PRL), da Proteína Ligadora do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1 (IGFBP-1) e Fator Tecidual (TF) (Dahmoun *et al.*, 1999; Cloke *et al.*, 2008). Durante a fase secretora, a vasculatura endometrial também apresenta sinais de diferenciação: a rede vascular se expande, as arteríolas espirais se tornam mais tortuosas e suas paredes espessas. Os linfócitos e os macrófagos começam a invadir o estroma no início da fase secretora e o grau de invasão aumenta conforme a fase secretora progride. Se a implantação não acontecer, a produção de estradiol e progesterona não será mais mantida pelo corpo lúteo, a descamação da camada funcional do endométrio e o sangramento menstrual irão ocorrer (Critchley e Saunders, 2009; Henriot, Gaide Chevronnay e Marbaix, 2012).

O endométrio humano sofre alterações morfológicas cíclicas que envolvem períodos precisos de crescimento, diferenciação e regressão a cada ciclo menstrual, durante toda a vida reprodutiva da mulher. Essas alterações são resultados das interações biológicas ocorridas entre citocinas e substâncias produzidas localmente sob o controle dos esteroides ovarianos (Curry e Osteen, 2003). Várias citocinas pertencentes à família TGF-beta encontram-se expressas no endométrio humano nas diferentes fases do ciclo menstrual, o que é consistente com as ações gerais desses membros, que estão relacionados à proliferação e remodelamento (Jones *et al.*, 2006). Recentemente a expressão de Nodal e Cripto foi avaliada no endométrio eutópico de mulheres saudáveis. Esse estudo mostrou que Nodal e Cripto estão expressos durante todo o ciclo menstrual, e que sua expressão protéica nas células estromais do endométrio diminui a partir do meio da fase secretora. Nesse sentido, os pesquisadores sugerem que a alta expressão do Nodal na fase proliferativa do ciclo menstrual pode ser relacionada ao papel que essa molécula desempenha na embriogênese (Papageorgiou *et al.*, 2009). Assim, estudos indicam que pelo fato do Nodal, Cripto e membros associados estarem abundantemente e diferentemente expressos no endométrio, qualquer alteração no seu padrão de expressão poderia resultar em distúrbios como infertilidade, abortos de repetição, disfunção útero-placentária, câncer cervical e endometriose (Jones *et al.*, 2006; Maruyama e



Yoshimura, 2008; Omwandho *et al.*, 2010; Singh, Chaudhry e Asselin, 2011; Park e Dufort, 2013).

### 1.2.2) Decidualização

A decidualização é definida como o processo de remodelamento endometrial o qual prepara o útero para a gravidez. Esse processo incluiu alterações nas glândulas uterinas, diferenciação das células estromais e remodelamento vascular (Maruyama e Yoshimura, 2008). Durante a decidualização, as células endometriais estromais adquirem características miofibrobláticas, tornam-se maiores e arredondadas e começam a secretar uma variedade de hormônios e citocinas (Gellersen e Brosens, 2003; Cloke *et al.*, 2008). No nível molecular, a decidualização envolve uma extensa reprogramação de várias funções celulares como alterações na expressão de receptores esteroides, na produção e no metabolismo dos hormônios esteroides, na estrutura da matriz extracelular e do citoesqueleto, na expressão de enzimas intracelulares, fatores de crescimento, citocinas e seus receptores e dos fatores de crescimento específicos da decídua (Popovici, Kao e Giudice, 2000; Gellersen e Brosens, 2003). Nesse sentido, o sucesso da implantação depende do desenvolvimento do embrião ao estágio de blastocisto e ao mesmo tempo depende das transformações sofridas pelo endométrio (Singh, Chaudhry e Asselin, 2011).

Os esteroides ovarianos estradiol e progesterona são os principais hormônios moduladores do desenvolvimento endometrial (Singh, Chaudhry e Asselin, 2011). A progesterona é essencial para a implantação e manutenção da gravidez em todos os mamíferos (Dey *et al.*, 2004). Estudos indicam que a progesterona inicia e direciona as ações do processo de decidualização, e nas células endometriais esse hormônio exerce suas ações através do seu receptor, o qual é membro da família de receptores nucleares. Basicamente, a progesterona se liga ao seu receptor e induz alterações conformacionais que promovem a dissociação do complexo de multi-proteínas. Essa ação é seguida pela homodimerização e ligação a Elementos Responsivos a Progesterona (PREs) na região promotora de genes alvo (Tsai e O'malley, 1994). Dois PREs estão localizados na região promotora do gene do IGFBP-

1 (Gao, Mazella e Tseng, 2002), um dos marcadores de decidualização (Cloke *et al.*, 2008; Maruyama e Yoshimura, 2008).

Após a implantação do embrião, o processo de decidualização persiste e se estende pelo endométrio. Como consequência, as células endometriais estromais (ESCs) adquirem a capacidade única de regular a invasão dos trofoblastos, de resistir às injúrias inflamatórias e oxidativas e de diminuir a resposta imune materna. Este processo é realizado através da produção local de várias substâncias biológicas como fatores de crescimento, citocinas, neuropéptídeos e componentes da matriz extracelular (Petraglia *et al.*, 1992; Dimitriadis *et al.*, 2005; Maruyama e Yoshimura, 2008). Assim, o processo de decidualização é crucial para o sucesso na implantação do embrião e na manutenção da gravidez (Maruyama e Yoshimura, 2008).

As células endometriais estromais humanas (hESCs) isoladas e cultivadas na presença de progesterona, em combinação com cAMP e/ou estradiol, apresentam alterações morfológicas e funcionais que mimetizam a transformação ocorrida *in vivo* (Gellersen e Brosens, 2003). Com o desenvolvimento da técnica de decidualização *in vitro*, pesquisas têm explorado os mecanismos que envolvem a transformação decidual, e uma vez que as hESCs produzem substâncias bioativas como fatores de crescimento e citocinas, estudos atuais indicam que esses agentes podem contribuir para a transformação decidual de um modo autócrino/parácrino (Petraglia *et al.*, 1992; Giudice, 1994; Dimitriadis *et al.*, 2005; Singh, Chaudhry e Asselin, 2011; Park e Dufort, 2013).

Membros da família TGF-beta estão expressos no endométrio e possuem ações ativas em eventos de modulação celular que envolvem o processo de proliferação, decidualização e implantação (Jones *et al.*, 2006). Embora o Nodal seja reconhecido pelas ações que desempenha durante o desenvolvimento do embrião, componentes da sua via de sinalização têm sido encontrados expressos no útero e estão ligados a diversos eventos importantes ocorridos na reprodução (Park e Dufort, 2011). Embora a expressão do Nodal tenha sido estudada durante o ciclo menstrual (Papageorgiou *et al.*, 2009), o preciso papel do Nodal no processo da decidualização e implantação ainda não está totalmente estabelecido (Park e Dufort, 2011). Até o

presente momento estudos indicam que para que a via de sinalização do Nodal seja ativada no útero, os receptores (ActR1B/C, ActRII A/B) e o coreceptor Cripto devem estar presentes. Todos eles foram detectados no útero, em todos os estágios do ciclo, apresentando níveis altos de expressão na fase secretora (Jones *et al.*, 2002; Papageorgiou *et al.*, 2009). No contexto do processo de decidualização propriamente dito, um único estudo avaliou a expressão de diversos membros da família TGF-beta, entre eles o Nodal, durante a decidualização e curiosamente a sua expressão não foi detectada (Stoikos *et al.*, 2008). Um estudo avaliou a presença da expressão proteica de Nodal no fluido uterino de mulheres saudáveis, indicando que o Nodal é secretado no lúmen uterino (Papageorgiou *et al.*, 2009).

Além das funções importantes que exerce durante a embriogênese, o Nodal exibe um padrão dinâmico de expressão no útero durante todo o período da gestação, e potencialmente desempenha múltiplos papéis no trato reprodutivo materno, incluindo a invasão trofoblástica e a formação da placenta (Park e Dufort, 2013). Estudos indicam que a sua expressão e ação desreguladas podem levar a uma falha absoluta ou parcial da decidualização endometrial e da implantação embrionária (Maruyama e Yoshimura, 2008; Park e Dufort, 2011; Singh, Chaudhry e Asselin, 2011; Park e Dufort, 2013).

### 1.3) Endometriose

A Endometriose é uma doença ginecológica estrógeno-dependente, caracterizada pela presença de tecido endometrial viável (Omwanho *et al.*) fora da cavidade uterina (Benagiano e Brosens, 1991; Eskenazi e Warner, 1997; Rogers *et al.*, 2009; Omwanho *et al.*, 2010). Esse tecido é denominado lesão endometriótica e pode ser encontrado nos ovários, no peritônio, nas tubas uterinas, na bexiga, nos intestinos e em outros órgãos (Koger *et al.*, 1993; Remorgida *et al.*, 2007; Bulun, 2009; Omwanho *et al.*, 2010). Estima-se que de 6-10% das mulheres em idade reprodutiva apresentem endometriose e que 35-50% delas apresentem sintomas como dor pélvica crônica, infertilidade, dismenorréia e dispareunia (Houston, 1984; Nap *et al.*, 2004; Bulun, 2009; Burney e Giudice, 2012). A endometriose é uma doença poligenética e multifatorial, no entanto o seu mecanismo fisiopatológico ainda não está completamente esclarecido

(Oliveira *et al.*, 2012). O mecanismo pelo qual as lesões se estabelecem fora da cavidade uterina e se tornam um tecido funcional permanece incerto e estudos têm proposto várias teorias para explicar esse desenvolvimento (Nap *et al.*, 2004; Bulun, 2009; Burney e Giudice, 2012; Oliveira *et al.*, 2012). Inicialmente proposta por Sampson, a teoria da menstruação retrógrada é a mais aceita pelo meio científico. De acordo com essa teoria, durante a menstruação, o endométrio eutópico descamado é transportado para a cavidade peritoneal através das tubas uterinas (Sampson, 1927). Outras hipóteses englobam a teoria da metaplasia celômica, a qual envolve a transformação do tecido peritoneal normal em tecido endometrial ectópico (Bulun, 2009); a teoria dos resquícios embrionários propõe que as células residuais do ducto mülleriano mantenham a capacidade de se desenvolver em lesões endometrióticas sob influência do estrogênio (Burney e Giudice, 2012). Essa teoria suporta a hipótese dos estudos que mostram um aumento no risco de duas vezes das mulheres expostas a dietilestilbestrol no útero de apresentarem endometriose (Missmer, Hankinson, Spiegelman, Barbieri, Malspeis, *et al.*, 2004). A teoria da metástase linfovascular afirma que a lesão endometriótica é resultado da disseminação linfática ou hematogênica das células endometriais (Sampson, 1927; Nap *et al.*, 2004). A forte evidência dessa teoria é baseada nos relatos histológicos que comprovaram as lesões endometrióticas localizadas em sítios distantes do útero como ossos, pulmões e cérebro (Jubanyik e Comite, 1997). A mais recente teoria proposta tem sido a das células tronco como origem do tecido endometriótico. Linhagens celulares candidatas incluem as células tronco mesenquimais da medula óssea e células progenitoras endoteliais (Sasson e Taylor, 2008; Oliveira *et al.*, 2012).

Os principais sintomas da endometriose são dor e infertilidade e os mecanismos desses sintomas são pouco conhecidos (Giudice e Kao, 2004; Berkley, Rapkin e Papka, 2005; Allaire, 2006; Bulun, 2009). O diagnóstico da endometriose é feito por laparoscopia, seguida de confirmação histológica do tecido ectópico endometrial (glândulas endometriais e estroma). Por apresentar uma variedade de sintomas inespecíficos, a endometriose é frequentemente confundida com outras doenças ou tem seus sintomas ignorados. Por isso, o tempo decorrido entre o início

dos sintomas e o diagnóstico da doença é longo, em torno de 6-9 anos (Husby, Haugen e Moen, 2003).

O tratamento inicial dos sintomas algícos da endometriose é medicamentoso, e são indicados os contraceptivos esteroides, prostágenos, agonistas do GnRH, andrógenos e antiinflamatórios não esteroidais (Lessey, 2000; Valle e Sciarra, 2003; Practice Committee of American Society for Reproductive, 2008).

Tanto o estrógeno quanto a progesterona são importantes reguladores do tecido endometrial, e cada hormônio é responsável por regular centenas de genes durante todas as fases do ciclo menstrual (Kao *et al.*, 2002). Estudos têm indicado que tanto o endométrio eutópico quanto o ectópico respondem aos estímulos do estrógeno e da progesterona (Hornung *et al.*, 1997; Vercellini, Cortesi e Crosignani, 1997; Zeitoun e Bulun, 1999). Alguns implantes endometrióticos atrofiam em resposta ao uso prolongado de anticoncepcionais, da mesma forma que o endométrio eutópico. No entanto, esse mesmo efeito não ocorre quando a lesão endometriótica está localizada no peritônio ou nos ovários, uma vez que a produção de citocinas, prostaglandinas, a biossíntese e o metabolismo dos hormônios esteróides são diferentes e a resposta dessas pacientes aos progestágenos já não é a mesma (Zeitoun e Bulun, 1999; Osteen *et al.*, 2002; Kao *et al.*, 2003). Assim, compreender como os esteroides ovarianos regulam a expressão de fatores autócrinos e parácrinos no endométrio e no implante endometriótico pode ajudar a desvendar como os implantes se tornam resistentes à atrofia induzida pela progesterona e como eles exibem uma resposta anormal ao estímulo estrogênico (Reis, Petraglia & Taylor, Hum Reprod Update 2013).

### 1.3.1) Endometriose e Infertilidade

A fecundidade, definida como a probabilidade de uma mulher ter um nascido vivo, varia de 15-20% por mês em casais normais, e de 2-10% em casais nos quais a mulher tem endometriose (Hughes *et al.*, 2007; Practice Committee of the American Society for Reproductive, 2012). A hipótese de que a endometriose causa infertilidade ou diminui a infertilidade permanece controversa (Practice Committee of the American Society for Reproductive, 2012). Estudos clássicos mostram que de 25-

50% das mulheres inférteis apresentam endometriose, e que de 30-50% das mulheres com endometriose são inférteis (Missmer, Hankinson, Spiegelman, Barbieri, Marshall, *et al.*, 2004; Practice Committee of the American Society for Reproductive, 2012).

Se a endometriose causa infertilidade, é natural esperar que o tratamento da doença restaure a fertilidade. Infelizmente, não é o que ocorre com os tratamentos farmacológicos disponíveis atualmente. Os mais bem aceitos são justamente os contraceptivos e nem eles nem os demais medicamentos promovem melhora da fertilidade, seja durante o uso, seja após a sua interrupção (Practice Committee of the American Society for Reproductive, 2012). Muitos mecanismos têm sido propostos para explicar a relação entre endometriose e a infertilidade (Bulun, 2009), tais como alteração na foliculogênese ou ovulação, defeitos na fase lútea, distorção da anatomia pélvica, defeitos na expulsão ou captação do oócito, diminuição na qualidade do embrião, alteração na função peritoneal, disfunção na resposta imune, disfunção uterina (Practice Committee of the American Society for Reproductive, 2004; Hughes *et al.*, 2007; Holoch e Lessey, 2010; Practice Committee of the American Society for Reproductive, 2012).

Adicionalmente à diminuição geral na expressão de citocinas e fatores de crescimento chave para a receptividade do útero, a via dos hormônios esteroides também está alterada na endometriose, o que prove uma explicação lógica tanto para os problemas associados à infertilidade quanto para a própria fisiopatologia da doença (Holoch e Lessey, 2010). Normalmente, no momento da implantação, os receptores de estrógeno estão menos ativos, e um aumento na progesterona deve ocorrer para que ocorra o sucesso na receptividade endometrial e na implantação do blastocisto (Kao *et al.*, 2002). Contudo, nas mulheres com endometriose, os receptores de estrógenos estão mais ativados (Lessey *et al.*, 1988) e as ações da progesterona, as quais são essenciais para a receptividade endometrial, estão diminuídas (Bulun, 2009). A progesterona induz a diferenciação tanto das células estromais quanto das células epiteliais do endométrio, causando assim alterações teciduais e de secreção, bem como diminuindo as figuras de mitose, o que faz com que a progesterona seja considerada uma molécula de diferenciação e limitadora do crescimento do endométrio

(Bulun *et al.*, 2006). Neste sentido, a progesterona age como um breque das ações estrogênicas, e é essencial para o sucesso da gravidez (Holoch e Lessey, 2010). Na endometriose, os receptores de progesterona estão desregulados tanto no endométrio eutópico quanto no ectópico. Uma diminuição da ativação desses receptores é vista antes da implantação no endométrio normal, mas essa ação não ocorre no endométrio das mulheres com endometriose (Mote *et al.*, 1999). Tanto o endométrio eutópico quanto o ectópico são resistentes às ações da progesterona, resultando em uma desregulação na disponibilidade de estrogênio, que não é adequada para a implantação (Lessey *et al.*, 1988; Macer e Taylor, 2012).

### 1.3.2) Endometriose e a via Nodal-Cripto

A endometriose é uma doença poligenética e multifatorial, no entanto o seu mecanismo fisiopatológico ainda não está completamente esclarecido (Oliveira *et al.*, 2012). Inúmeros fatores de crescimento e citocinas têm sido relacionados ao seu mecanismo, e estudos recentes sugeriram que membros da família TGF-beta poderiam estar relacionados com a fisiopatologia dessa doença (Mabuchi *et al.*, 2010; Omwandho *et al.*, 2010).

O primeiro relato a respeito do Nodal e do Cripto na endometriose foi feito por Torres e colaboradores, que avaliaram a expressão gênica de ambos no endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose e na endometriose ovariana, nas fases proliferativa e secretora do ciclo. Os pesquisadores encontraram uma diminuição na expressão gênica de Cripto, mas não de Nodal, na fase proliferativa do ciclo, no endométrio eutópico de mulheres com endometriose. Diante dos achados, eles sugeriram o envolvimento dessa via na fisiopatologia da endometriose, e que estudos a nível proteico seriam necessários para melhor compreender o mecanismo de ação dessas moléculas (Torres *et al.*, 2009). Um segundo trabalho foi publicado pelo mesmo grupo, mostrando os mesmos achados (Rocha *et al.*, 2011).

Até o presente momento, nenhum outro trabalho foi encontrado na literatura relacionando endometriose e a via Nodal-Cripto.

O Nodal tem sido intitulado como um importante agente pro-tumorigênico. Pesquisadores têm avaliado essa via como um potencial marcador para

diversos tipos de câncer, inclusive para o câncer de endométrio, câncer de ovário e de mama (Papageorgiou *et al.*, 2009; Strizzi, Hardy, Margaryan, *et al.*, 2012; Quail *et al.*, 2013). A presença do Nodal no estágio avançado de câncer e a sua relativa ausência de expressão na maioria dos tecidos adultos saudáveis o torna um interessante alvo terapêutico (Strizzi, Hardy, Kirschmann, *et al.*, 2012). De fato, novos estudos são necessários para avaliar como esse morfógeno sinaliza tanto no tecido saudável como no tecido doente, incluindo experimentos funcionais e estudos em tecidos com funções específicas (Quail *et al.*, 2013).

## 2) Justificativa

A endometriose é uma doença ginecológica que atinge muitas mulheres, provocando



dor e infertilidade. Até o presente momento, requer diagnóstico invasivo, feito por laparoscopia seguida de confirmação histológica. Como os sintomas da endometriose são confundidos com os de outras doenças, o diagnóstico da endometriose é demorado, o que traz grandes prejuízos às pacientes.

A comunidade científica tem estudado amplamente a fisiopatologia da endometriose, no intuito de entender o seu mecanismo e propor um biomarcador que fizesse com o que o diagnóstico se tornasse rápido, não invasivo e eficiente. No entanto, as tentativas foram frustradas e os biomarcadores até hoje encontrados têm baixa acurácia.

Uma vez que membros da família TGF $\beta$  estão relacionados com diversas condições fisiológicas e patológicas do endométrio, torna-se interessante avaliar o papel do nodal e de proteínas relacionadas ao seu mecanismo de ação na fisiopatologia da endometriose, com o objetivo de entender melhor o mecanismo da doença e identificar um novo biomarcador e um possível alvo para intervenções farmacológicas para o tratamento dessa doença.

### 3) Objetivos

#### 3.1) Objetivo Geral

Avaliar o papel do Nodal no endométrio e na fisiopatologia da endometriose.

#### 3.2) Objetivos Específicos

- Avaliar se o tratamento agudo por 24 horas das células estromais endometriais com estradiol, progesterona, ou estradiol associado à progesterona altera a expressão gênica de Nodal, de Cripto, da Smad 4 e da Smad 7, e a concentração proteica de Nodal;
- Observar a evolução temporal da expressão gênica de Nodal e Cripto durante o processo de decidualização das células estromais endometriais humanas cultivadas *in vitro* e a concentração proteica de Nodal;
- Avaliar a expressão do Nodal e de proteínas relacionadas ao seu mecanismo de ação no endométrio eutópico de mulheres saudáveis e no endométrio eutópico de pacientes com endometriose.

#### 4) Metodologia

##### 4.1) Experimentos “*in vitro*”

Os experimentos “*in vitro*” foram conduzidos no *Center for Research in Reproduction and Infertility*, situado na School of Molecular and Cellular Biology, University of Illinois at Urbana-Champaign, IL, USA.

##### 4.1.1) Cultivo de Células Estromais Endometriais Humanas

As células estromais endometriais humanas (hESC) foram doadas pelo Dr. Robert Taylor, Wake Forest, School of Medicine, Winston-Salem, NC, USA. Elas foram derivadas de 4 mulheres na idade reprodutiva, na fase proliferativa, com ciclos menstruais regulares, e que não faziam uso de anticoncepcionais orais há mais de 3 meses.

As hESCs foram cultivadas em monocamadas em frascos com DMEM/F-12 (1:1) (GIBCO, Invitrogen, CA, USA) contendo 1% de antibióticos/antimicóticos e Soro Bovino Fetal a 5%. As células foram cultivadas até chegarem a 70% de confluência e então lavadas com PBS, tripsinizadas e colocadas em cultivo novamente. O termo passagem correspondeu à quantidade de vezes em que as células foram tripsinizadas e replaqueadas.

Após a segunda passagem, células estromais foram morfologicamente analisadas quanto a sua pureza pela técnica de imunofluorescência por incubação com anticorpos para faloidina e vimentina (Oncogene Science, Uniondale, NY, USA) para avaliar a pureza das células que estavam em cultivo.

Após o cultivo até a quarta passagem, o meio de cultura foi trocado por meio composto por DMEM/F-12 e *heat inactivated charcoal stripped fetal calf serum* (csFCS, Trace Biosciences) a 5% por 24 horas para que as células entrassem em quiescência, e assim os tratamentos pudessem ser iniciados.

##### 4.1.2) Estímulo hormonal agudo

Os experimentos de estímulo hormonal agudo consistiram na exposição das células a um estímulo com 17- $\beta$  Estradiol ( $E_2$ ) (10nM), ou com Progesterona ( $P_4$ ) (1 $\mu$ M), ou com a associação de  $E_2+P_4$  ou com a associação de  $E_2+P_4+8$ -bromo-AMPC (0.5 mM) (Zhao *et al.*, 2013) por 24 horas (n=4). O grupo controle não recebeu nenhum

tratamento hormonal (n=4). Findo o tempo do estímulo hormonal, as células foram coletadas para posterior estudo da expressão de Nodal (mRNA e proteína), Cripto, Smad 4 e Smad 7 (mRNA).

#### 4.1.3) Decidualização

Durante o período de decidualização, as hESC foram incubadas e tratadas com 17- $\beta$  Estradiol (10nM) + Progesterona (1 $\mu$ M) + 8-bromo-AMPC (0.5 mM) por 8 dias (Li *et al.*, 2013) (n=4). As células foram coletadas nos seguintes tempos: 0h (CTRL), Dia 1 (D1), Dia 2 (D2), Dia 4 (D4), Dia 6 (D6) e Dia 8 (D8), com o objetivo de avaliar a expressão de Nodal e Cripto durante a decidualização. Para esta análise foram feitas as técnicas de PCR-real time para Nodal e Cripto e Western Blot para Nodal.

#### 4.1.4) Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real

Após os experimentos, as células foram coletadas com TRIZOL e mantidas em freezer -80°C até serem processadas e analisadas.

Foi feita a extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA) conforme descrição prévia (Zhao *et al.*, 2013). O RNA total foi extraído de acordo com o manual de instruções do TRIZOL, e a Transcrição Reversa foi feita utilizando o kit de síntese de cDNA da Invitrogen.

A expressão gênica de Nodal, Cripto, Smad 4 e Smad 7 foi avaliada por PCR em tempo real, em volume final de 20  $\mu$ l. A reação consistiu de 2  $\mu$ l de cDNA e 18  $\mu$ l de uma solução mix composta por 7  $\mu$ l de água para PCR (esterilizada e filtrada), 1  $\mu$ l do primer mix (5 $\mu$ M) (Invitrogen, Brasil) e por 10  $\mu$ l de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Warrington WA, UK). Cada amostra foi analisada em triplicata, inclusive os controles negativos, que tiveram o cDNA substituído pelo produto de reação feita na ausência de transcriptase reversa. As reações de PCR foram realizadas em equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems, Warrington WA, UK) no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 95°C/10 min.; [estágio 2] 40 ciclos de 95°C/15 segundos, 60°C/15 segundos e 72°C/20segundos; [estágio 3] 95°C/15 segundos, 54°C/15 segundos e 95°C/15 segundos. Os resultados foram corrigidos pela expressão do gene normalizador 36B4. Como controle de qualidade do experimento, foram

também avaliados os marcadores da decidualização PRL e IGFBP-1. A localização e sequência dos oligonucleotídeos sintetizados estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos *primers* para a reação de PCR em tempo real dos genes-alvo do 36B4, IGFBP-1, Prolactina, Nodal, Cripto, Smad 4 s Smad 7.

<i>Primers</i>	<i>Sequência de nucleotídeos</i>
Fw – 36B4 (senso) Rv- 36B4 (antisenso)	GTGTTTCGACAATGGCAGCAT GACACCCTCCAGGAAGCGA
Fw – IGFBP-1 (senso) Rv- IGFBP -1 (antisenso)	CTATGATGGCTCGAAGGCTC TTCTTGTTGCAGTTTGGCAG
Fw – Prolactina (senso) Rv- Prolactina (antisenso)	CTACATCCATAACCTCTCCTCA GGGCTTGCTCCTTGTCTTC
Fw – Nodal (senso) Rv- Nodal (antisenso)	AGGGCGAGTGTCTAATCCT TTCACTGGGGCACAACAAGT
Fw – Cripto (senso) Rv- Cripto (antisenso)	CCAGATCCTTGGGAGAGGGA TCGCTGTTGTTCTGCTGTCT
Fw – Smad 4 (senso) Rv- Smad 4 (antisenso)	TGCATTCCAGCCTCCCATTT GCACACCTTTGCCTATGTGC
Fw – Smad 7 (senso) Rv- Smad 7 (antisense)	CCCATCACCTTAGCCGACTC TGGACAGTCTGCAGTTGGTT

#### 4.1.5) Western Blot

Durante a extração de RNA com TRIZOL, a fase fenol-clorofórmica foi armazenada para extração de proteínas totais. A extração de proteínas foi feita seguindo o protocolo do TRIZOL<sup>®</sup>: foram adicionados 300µl de etanol a 100% e em seguida as amostras foram homogeneizadas manualmente e incubadas por 3 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram centrifugadas a 2000g por 5 minutos a 4°C para formar o pellet de DNA. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado 1,5ml de isopropanol em cada tubo, e as amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas a 12000g por 10 minutos a 4°C para formar o pellet de proteínas. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 2ml de uma solução composta por hidrocloguanidina 0,3M diluída em etanol a 95%. As amostras foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente e então centrifugadas a 7500g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o passo da lavagem foi repetido por mais duas vezes. Após o descarte da última lavada foram adicionados 2ml de etanol a 100% e o material foi homogeneizado no vortex. As amostras foram mantidas por 20 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 7500g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram invertidas a fim de secar o excesso de reagente, por aproximadamente 10 minutos. O pellet foi ressuspenso em 80µl de SDS a 1% e a solução foi centrifugada a 10000g por 10 minutos a 4°C para sedimentar reagentes insolúveis. O sobrenadante contendo a proteína foi transferido para um novo tubo. A quantificação de proteína total foi feita usando o kit BCA Protein Assay Reagent (Thermo Scientific). Após a quantificação as amostras foram acrescidas de tampão Tris-HCl pH 6,8 contendo SDS, glicerol, azul de bromofenol e β-mercaptoetanol, e mantidas em banho quente seco a 75°C por 15 minutos.

As proteínas foram separadas em gel SDS-PAGE 10%. O marcador de massa molecular utilizado foi o Prestain Protein Ladder (BioRad). A corrida eletroforética foi feita a 75V nos primeiros 30 minutos, até que as amostras passassem pelo gel de empacotamento, e depois a 85v por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Após a corrida foi feita a transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose utilizando o Gel Transfer Set (BioRad), overnight a 25V, a 4°C.

Depois da transferência, a membrana foi bloqueada com leite desnatado a 5% diluído em PBS por uma hora em temperatura ambiente, sob agitação. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com TBS-T (TBS pH 8,0 com Tween 20 a 0,05%) e em seguida incubada com o anticorpo primário Anti-Nodal (Novus Biologicals®) na diluição de 1:500, overnight, a 4°C, sob agitação. A seguir, a membrana foi novamente lavada com TBS-T e em seguida foi feita a incubação com o anticorpo secundário contra IgG de cabra (Santa Cruz Biotechnology), 1:5000 por 1 hora a temperatura ambiente. Após a incubação a membrana foi lavada com TBS-T e então foi feita a revelação em filme com o reagente SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

Após a revelação, a membrana foi novamente lavada com TBS-T e em seguida foi lavada com o reagente Western Blot Recovery (Thermo Scientific) para a remoção do anticorpo primário anti-Nodal. Em seguida a membrana foi lavada novamente em TBS-T, bloqueada com leite desnatado a 5% em PBS por 1 hora à temperatura ambiente e incubada com o anticorpo primário anti-Calnexina (Santa Cruz) na diluição de 1:500 à temperatura ambiente por 1 hora e 30 minutos (normalizador). Foram feitas as lavagens com TBS-T, e a membrana foi incubada com o anticorpo secundário contra IgG de coelho (Santa Cruz) na diluição 1:1000, por 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação a membrana foi lavada novamente com TBS-T e revelada em filme com o reagente SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate® (Thermo Scientific).

As análises dos filmes foram feitas utilizando o software Image J, onde a densidade das bandas do Nodal foi normalizada pela densidade das bandas da calnexina, e uma densidade relativa foi calculada.

#### 4.2) Estudo de biópsias endometriais de mulheres com e sem endometriose

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE 0199.0.203.000-11) e todas as participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 1).

##### 4.2.1) Pacientes

Para o estudo do endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose (n= 9 e 10, respectivamente), foram incluídas pacientes com infertilidade conjugal que realizaram histeroscopia diagnóstica no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da UFMG no período de novembro de 2010 a outubro de 2011. A idade das voluntárias variou de 22 a 43 anos e foi semelhante entre os grupos de mulheres com e sem endometriose ( $37,3 \pm 4,7$  anos e  $33,2 \pm 5,4$  anos, respectivamente,  $p= 0,095$ ).

#### 4.2.2) Obtenção das amostras

Amostras de endométrio foram obtidas por biópsia aspirativa ambulatorial com Pipelle (Unimar Inc., Prodimed, Neuilly-en-Thelle, France) na fase proliferativa inicial do ciclo menstrual, imediatamente após a realização da histeroscopia,. Não foram incluídas pacientes com achados histeroscópicos patológicos, como pólipos ou miomas. Em todos os casos de endometriose o diagnóstico da doença foi confirmado previamente por exame anatomopatológico de biópsia de lesão endometriótica.

Duas porções do tecido endometrial foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para extração de mRNA (RT-PCR-real time) e análise proteica por Western Blot, e outra porção foi fixada em Histochoice® (AMRESCO) para realização da imuno-histoquímica.

#### 4.2.3) Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real

Os fragmentos de endométrio eutópico de mulheres com endometriose (n=6) e sem endometriose (n=6) foram submetidos à extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA) conforme descrição prévia (Torres *et al.*, 2009).

A expressão gênica de Nodal, Cripto, Smad 3 e Smad 4 foi avaliada por PCR em tempo real, em volume final de 20  $\mu$ l. A reação consistiu de 2  $\mu$ l de cDNA e 18  $\mu$ l de uma solução mix composta por 7  $\mu$ l de água para PCR (esterilizada e filtrada), 1  $\mu$ l do primer mix e 10  $\mu$ l de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Warrington WA, UK). Cada amostra foi analisada em duplicata, inclusive os controles negativos, que tiveram o cDNA substituído pelo produto de reação feita na ausência de transcriptase reversa. As reações de PCR foram realizadas em equipamento ABI Prism 7500 SDS (Applied Biosystems, Warrington WA, UK) no seguinte ciclo termal: [estágio



1] um ciclo de 50°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo de 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/15 segundos e 60°C/1 min. Os resultados foram corrigidos pela expressão do gene que codifica a proteína ribossomal S26. Os oligonucleotídeos sintetizados estão apresentados na Tabela 2

Tabela 2 - Oligonucleotídeos *primers* para a reação de PCR em tempo real dos genes-alvo do S26, Nodal, Cripto, Smad 3 e Smad 4.

<i>Primers</i>	<i>Sequência de nucleotídeos</i>
Fw – S26 (senso) Rv- S26 (antisenso)	AAGGAACAATGGTCGTGCCA ATCGGGCACAGTTAGTGCAG
Fw – Nodal (senso) Rv- Nodal (antisenso)	ACTGTGTCCGGAAGGTCAAGTTCCA ACAGCGATAGGCGTTGTAAGTCTT
Fw – Cripto (senso) Rv- Cripto (antisenso)	TTTGAAGTGGGATTAGTTGCCGGG GGGCCAAATGCTGTCATCTCTGAA
Fw – Smad 3 (senso) Rv- Smad 3 (antisenso)	AGTTGAGGCGAAGTTTGGGC CTGCCCGTCTTCTTGAGTT
Fw – Smad 4 (senso) Rv- Smad 4 (antisenso)	TTTCCCAACATTCCTGTGGCTTCC AAATCCATTCTGCTGCTGTCCTGG

#### 4.2.4) Imunohistoquímica

##### 4.2.4.1) Inclusão e corte

As amostras fixadas em HistoChoice<sup>®</sup> (AMRESCO) foram desidratadas em etanol a concentrações crescentes, variando de 80% a 99%, depois imersas em xilol e em parafina a 60°C. A seguir, foram incluídas em blocos de parafina, deixadas por pelo menos 24 horas para solidificar. Os blocos foram resfriados e seccionados num micrótomo em cortes de 4 µm de espessura que, dispostos num banho aquecido, foram cuidadosamente transferidos para as lâminas de vidro. A seguir, essas lâminas foram aquecidas em estufa de 37°C por 24 horas para fazer escorrer o excesso de parafina dos cortes histológicos.

##### 4.2.4.2) Protocolo

Após incubação das lâminas por 24 horas em estufa a 56°C, as mesmas foram submetidas ao processo de desparafinização, em xilol, e reidratadação, em série de soluções de álcoois em concentrações decrescentes. A recuperação antigênica induzida pelo calor foi realizada em microondas, para melhor exposição dos epitopos de interesse, utilizando tampão *Ethylendiamine Tetraacetic Acid* (EDTA).

Todas as etapas da IHQ foram realizadas com os reagentes do sistema de amplificação por polímeros não biotinizados Novolink (Novocastra<sup>®</sup>, New Castle Upon Tyne, UK). A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada com o *peroxidase block* por 5 minutos. Para reduzir a coloração de fundo, os cortes foram incubados por cinco minutos com o *protein block*. Os cortes foram posteriormente incubados com os anticorpos primários policlonais de coelho adquiridos da Abcam<sup>®</sup> (Cambridge, Reino Unido) nas seguintes diluições: Smad 3 - 1:50; Smad 3 fosforilada – 1:50 e Smad 4 – 1:50. As lâminas foram incubadas overnight a 4°C. Após a incubação, a cada lâmina foi aplicado o *post primary block* por 30 minutos e depois o reagente polímero por 30 minutos. Para a revelação das reações foi utilizada diaminobenzidina (DAB) e para contracoloração foi utilizada hematoxilina de Harris, ambas fornecidas no próprio sistema Novolink.

#### 4.2.4.3) Avaliação das lâminas

As lâminas foram fotografadas utilizando o microscópio óptico Zeiss e as imagens obtidas foram analisadas utilizando o software Image J.

Para as análises, primeiramente foi feita calibração da leitura pelas imagens do controle negativo. Para marcação celular nuclear, o programa avaliou a porcentagem das células marcadas, e para as marcações citoplasmática e de membrana foi feita a avaliação da intensidade da marcação.

#### 4.2.5) Western Blot

##### 4.2.5.1) Extração e quantificação de Proteínas totais

As amostras foram homogeneizadas em 100µl do tampão de lise RIPA (composto por 50mM Tris, 150mM NaCl, 1% Triton-100, 1% Deoxicolato, 0,1% SDS, 1mM PMSF, 10,28mM Ortovanadato de Sódio, 10,09mM Pirofosfato de sódio, 100mM Fluoreto de sódio), preparado manualmente, associado a uma pastilha de SigmaFast<sup>®</sup> (2mM AEBSF, 1mM EDTA, 130µM Bestatina, 14µM E-64, 1µM Leupeptina, 0,3µM Aprotinina). O tampão de extração foi preparado na hora do uso e as amostras foram homogeneizadas no gelo. Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 20 minutos, o sobrenadante foi mantido e o resíduo descartado; em seguida, as amostras foram incubadas a 95°C por 10 minutos para que ocorresse a desnaturação das proteínas.

As amostras foram quantificadas pelo método de Bradford, utilizando como proteína padrão a Albumina na concentração de 1mg/ml. As leituras foram feitas utilizando o equipamento de leitor de ELISA no comprimento de onda de 595nm. As amostras foram aliquotadas e armazenadas em freezer -80°C.

##### 4.2.5.2) Eletroforese

40 µg de cada amostra foram submetidos à eletroforese em SDS-PAGE (acrilamida/bis acrilamida 29:1), sendo o gel de separação a 12,5% preparado em tampão contendo 1,5M de Tris-HCl, pH 8,8 e 0,4% de SDS e o gel de empacotamento (*stacking gel*) a 4% em tampão contendo 0,5M de Tris-HCl, pH 6,8 e 0,4% SDS. A composição do tampão da corrida da eletroforese foi 25mM de Tris-HCl pH 8,4, 200mM de Glicina e 1% de SDS. Em uma canaleta foi colocado o padrão de

peso molecular BenchMark™ pré-marcado para nos orientar durante a corrida e posteriormente durante a transferência. A corrida de eletroforese foi feita a 60v até que as amostras passassem pelo gel de empacotamento, e depois a voltagem foi aumentada para 75v. O tempo total da corrida foi de 2 horas.

#### 4.2.5.3) Transferência

Após a corrida de eletroforese, as bandas proteicas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose utilizando-se o tampão com 25mM de Tris, 193mM de Glicina e 20% de Metanol. A transferência foi feita em sistema semi-seco da BioRad®, a 20v por 5 minutos. A eficiência da transferência foi comprovada pela transferência do padrão de peso molecular pré-marcado do gel para a membrana.

#### 4.2.5.4) Protocolo

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi incubada por 1 hora em um solução constituída de leite em pó desnatado a 5% e TBS (10mM de Tris-HCl pH 7,4 e 0,9% de NaCl), a temperatura ambiente, sob agitação leve. Após esse período a membrana foi lavada por 3 vezes 5 minutos cada com TBS-Tween 20, em temperatura ambiente e sob agitação leve. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (Nodal: 1:200, Cripto 1:200 e  $\beta$ -actina 1:500) diluído em TBS, por 24 horas a 4°C. Após esse período a membrana foi lavada por 3 vezes de 5 minutos cada com TBS-Tween 20, em temperatura ambiente e sob agitação leve, e em seguida incubada com o anticorpo secundário. Para  $\beta$ -actina foi utilizado o secundário anti-mouse 1:1000 e para o Nodal e Cripto anti-goat 1:1000, diluído em TBS, por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação leve. Em seguida foram feitas 3 lavagens de 5 minutos cada com TBS-Tween 20, em temperatura ambiente e sob agitação leve. Após esse período a membrana foi incubada por 30 minutos com o kit ABC da Vectastain®.

#### 4.2.5.5) Revelação

As bandas das proteínas  $\beta$ -actina, Nodal e Cripto foram reveladas utilizando os reagentes DAB (Sigma®) e Cloronaftol (Sigma®). Esses dois reagentes foram divididos em duas soluções, uma contendo o DAB diluído em PBS, e outra o Cloronaftol diluído em metanol e PBS. Essas duas soluções foram misturas e

foi adicionado peróxido de oxigênio, e em seguida essa nova solução foi colocada em contato com a membrana.

#### 4.3) Análise Estatística

Os resultados do PCR em tempo real foram expressos como  $\Delta Ct$ , que é o *threshold cycle* (Ct) dos genes-alvo menos o Ct do gene de referência (36B4 ou S26). A expressão gênica relativa foi calculada como *fold change*, definido pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  médio do grupo com endometriose –  $\Delta Ct$  médio do grupo controle, no caso dos tecidos, ou  $\Delta Ct$  médio dos tratamentos ou tempos de decidualização –  $\Delta Ct$  médio do controle, no caso das culturas celulares. As análises foram realizadas tendo por base o  $\Delta Ct$ , que é a fonte primária da variação (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Os cálculos estatísticos foram feitos no programa GraphPad Prism 6. Os dados foram avaliados pelo teste de Kolmogorov–Smirnov e não diferiram significativamente da distribuição normal, por isto foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação entre dois grupos independentes. A análise de variância (ANOVA) de Friedman foi usada para comparar os diversos tratamentos hormonais e tempos de decidualização, pareando os resultados oriundos da mesma cultura celular. Havendo diferença significativa na ANOVA, utilizou-se o teste de Dunn para comparações múltiplas entre os estímulos hormonais e o respectivo controle. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

## 5) Resultados

### 5.1) Experimentos *in vitro*

#### 5.1.1) Cultivo de Células Estromais Endometriais Humanas

A imunofluorescência para as células estromais endometriais está apresentada na FIGURA 4. Foram utilizados anticorpos contra Faloidina e Vimentina, duas proteínas expressas em células estromais e ausentes em outros tipos de células endometriais. Como se vê na figura, todas as células apresentaram coloração para faloidina (B) e vimetina (C), confirmando a pureza das culturas de células estromais.

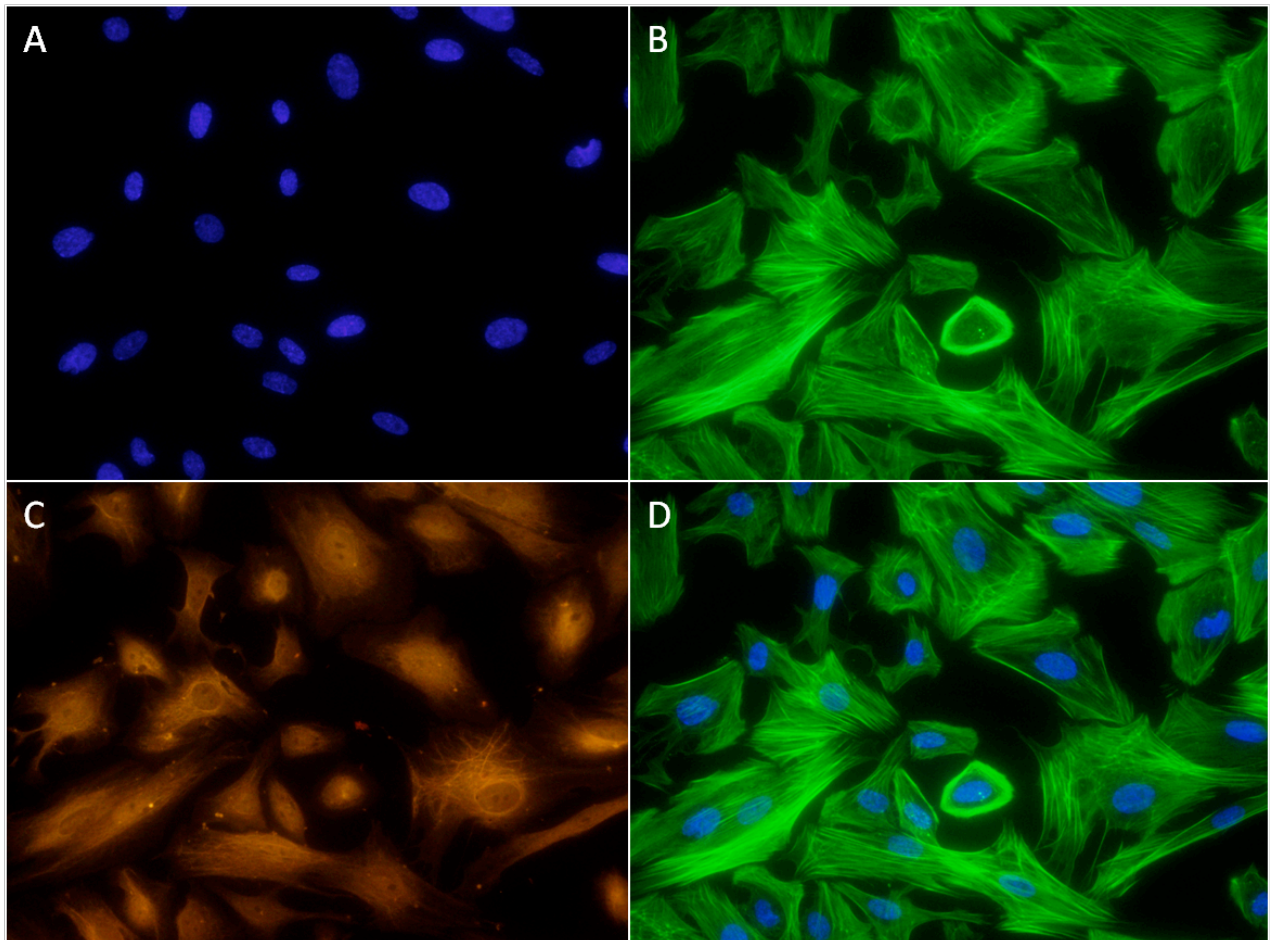


FIGURA 3 - Marcação imunofluorescente para células estromais endometriais. A. DAPI – marcação nuclear; B. Faloidina – filamentos de actina; C. Vimentina – mesênquima celular; D. Sobreposição das imagens.

### 5.1.1.1) Estímulo hormonal agudo

A expressão gênica do Nodal e do Cripto avaliada por RT-PCR nas células endometriais estromais tratadas ou não por 24 horas com Estrógeno, Progesterona, Estrógeno + Progesterona e Estrógeno + Progesterona + cAMP está apresentada nos Gráficos 1 e 2. Não foi observada diferença significativa na expressão gênica do Nodal e do Cripto entre os tratamentos realizados ( $p > 0,05$ ).

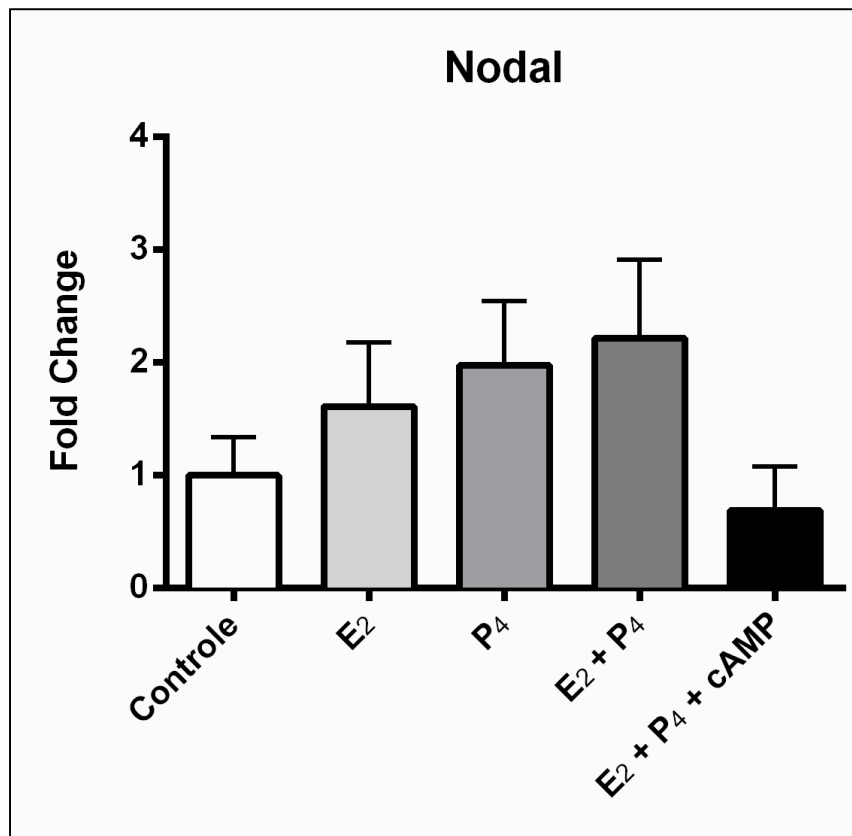


Gráfico 1 – Expressão gênica do Nodal durante o tratamento com Estrógeno, Progesterona, Estrógeno + Progesterona e Estrógeno + Progesterona + cAMP por 24 horas (n=4). ANOVA de Friedman,  $p > 0,05$ .

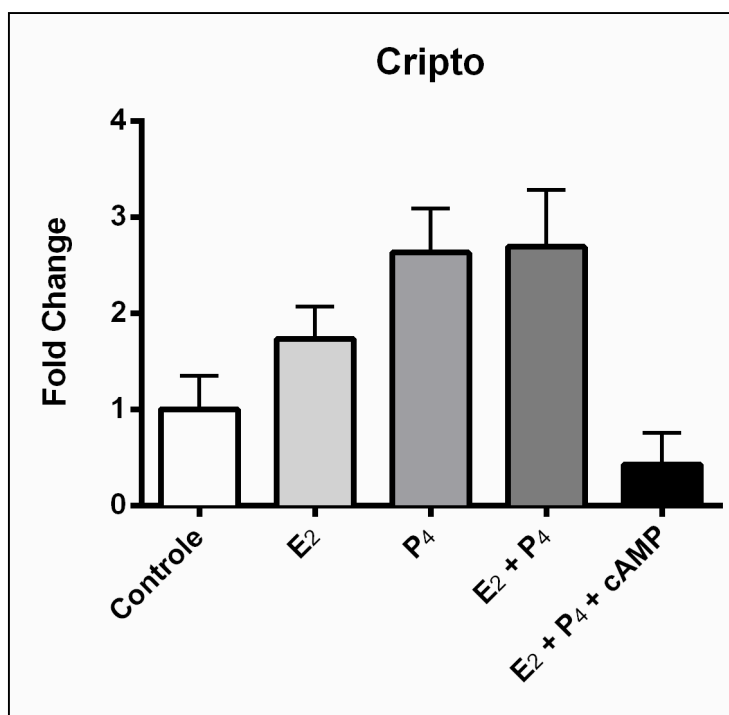


Gráfico 2 – Expressão gênica do Cripto durante o tratamento com Estrógeno, Progesterona, Estrógeno + Progesterona e Estrógeno + Progesterona + cAMP por 24 horas (n=4). ANOVA de Friedman,  $p > 0,05$ .

A expressão proteica de Nodal foi avaliada por Western Blot e os resultados encontrados estão apresentados na Figura 4. Foi possível observar um aumento na sua expressão proteica quando as células endometriais estromais foram tratadas com estrógeno + progesterona ( $p < 0,01$ ).



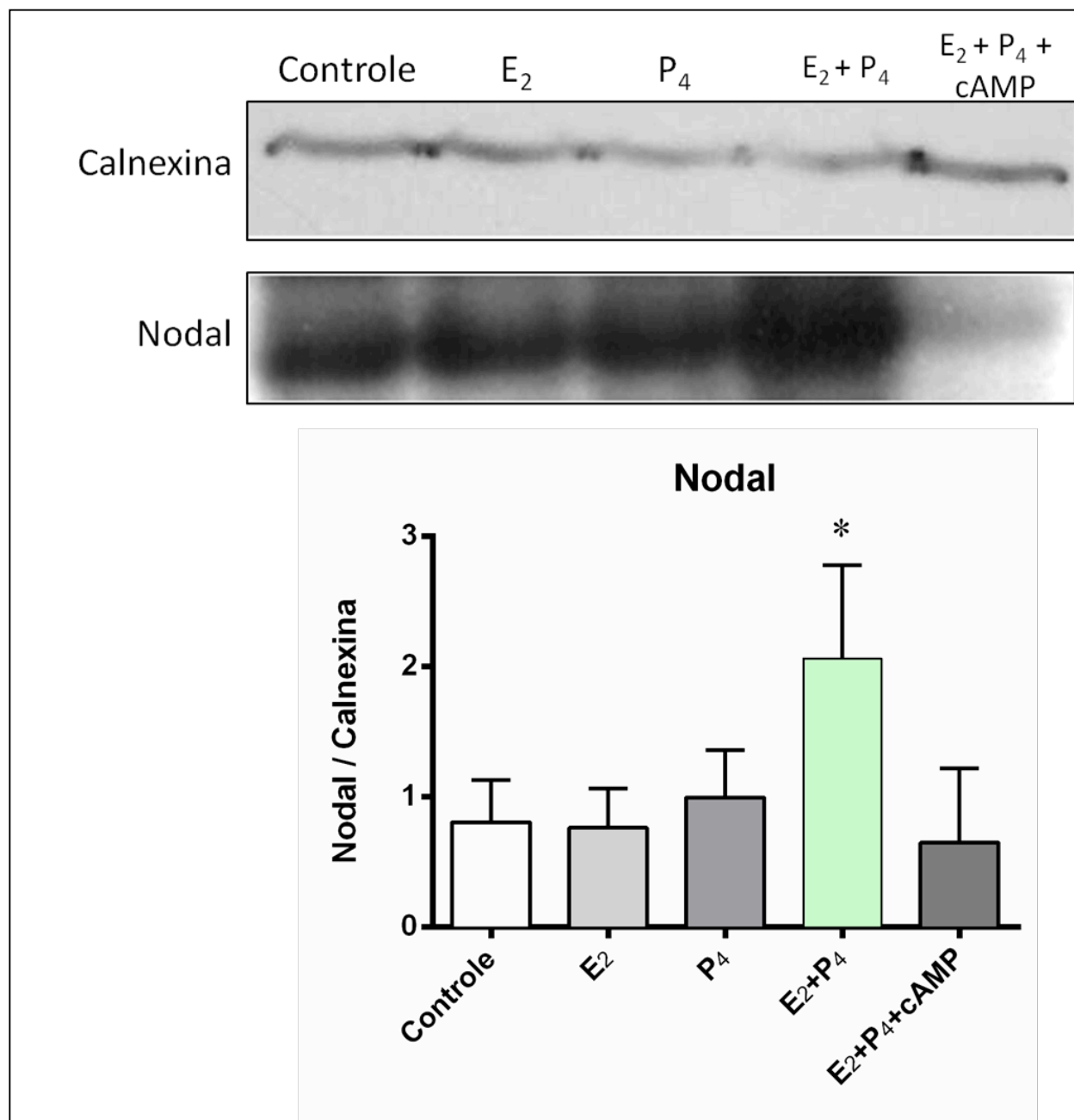


Figura 4 - Expressão proteica do Nodal em células estromais endometriais, tratadas ou não com Estrógeno, Progesterona, Estrógeno + Progesterona e Estrógeno + Progesterona + cAMP por 24 horas (n=4). A banda de expressão da Calnexina foi observada em ~75 kDa e a do Nodal em ~ 40kDa. A calnexina foi utilizada como controle interno. ANOVA de Friedman e teste de Dunn,  $p < 0,01$ .

A expressão gênica da Smad 4 e da Smad 7 também foi avaliada por RT-PCR quantitativo em células endometriais estromais tratadas com hormônios ovarianos por 24 horas. Foi possível observar um aumento na expressão gênica tanto da Smad 4 quanto da Smad 7 quando as células foram tratadas apenas com progesterona (Gráficos 3 e 4,  $p < 0,04$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente).

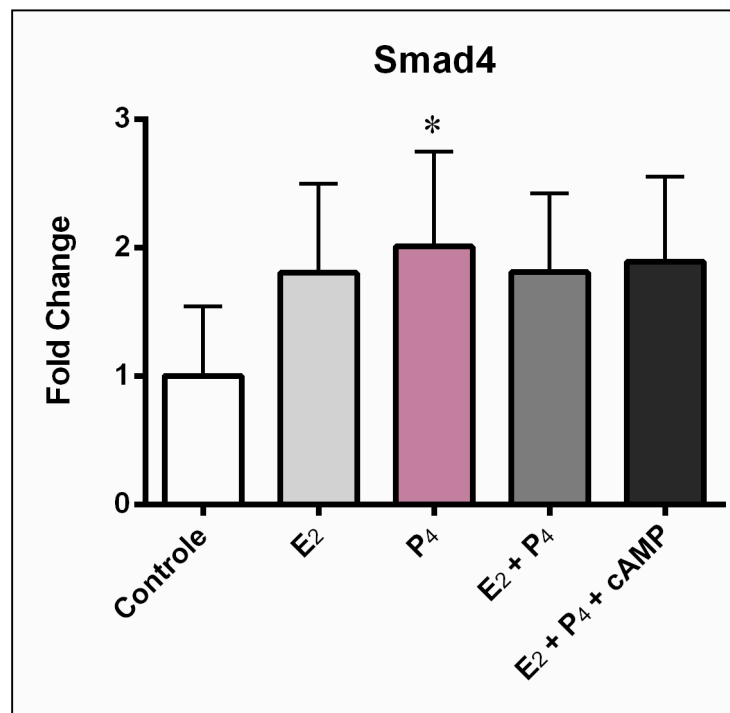


Gráfico 3 – Expressão gênica da Smad 4 durante o tratamento com Estrógeno, Progesterona, Estrógeno + Progesterona e Estrógeno + Progesterona + cAMP por 24 horas (n=4). ANOVA de Friedman e teste de Dunn,  $p < 0,04$ .

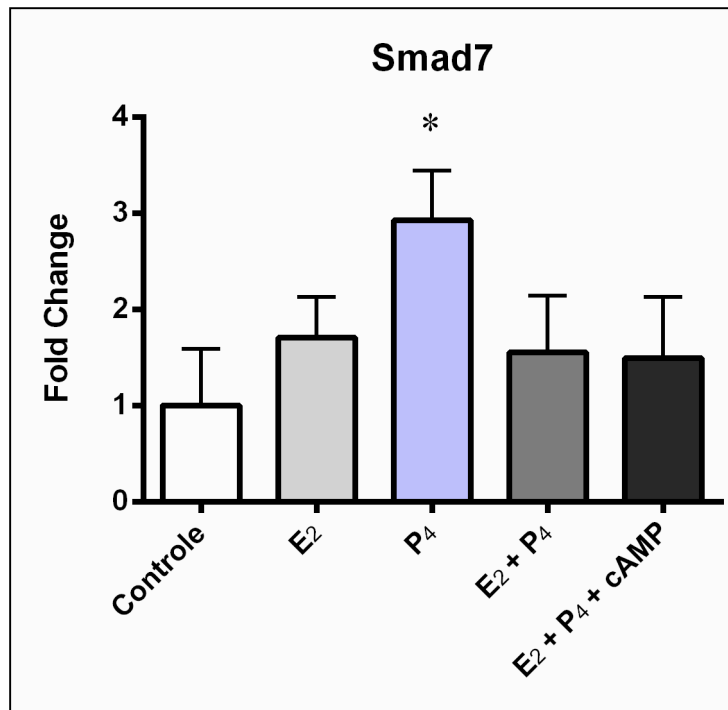


Gráfico 4 – Expressão gênica da Smad 7 durante o tratamento com Estrógeno, Progesterona, Estrógeno + Progesterona e Estrógeno + Progesterona + cAMP por 24 horas (n=4). ANOVA de Friedman e teste de Dunn,  $p < 0,0001$ .

#### 5.1.1.2) Decidualização

A Figura 5 apresenta as alterações morfológicas das células estromais endometriais durante o tratamento de 8 dias com estradiol + progesterona + AMP cíclico (E<sub>2</sub>+P<sub>4</sub>+ cAMP). Observa-se a mudança gradual do formato das células, que perderam o aspecto fusiforme, característico de fibroblastos, e adquiriram forma mais arredondada, típica das células da decídua (Tang, Guller e Gurrpide, 1994; Irwin *et al.*, 1996). Como controle do processo de decidualização além das características morfológicas, também foi analisada a expressão gênica da PRL e IGFBP-1, marcadores do processo de decidualização (Gráfico 5).

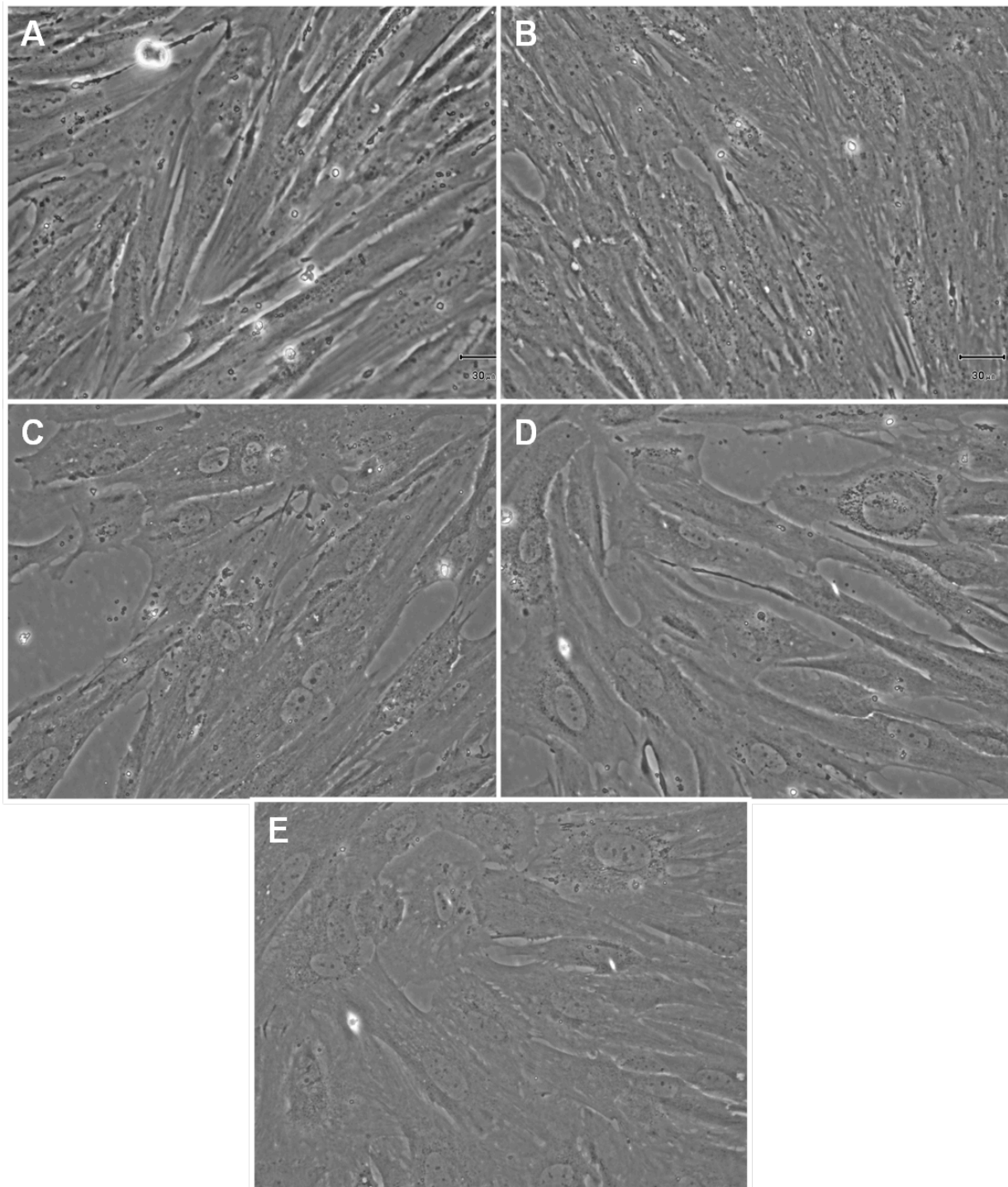


FIGURA. 5 - A. Células estromais endometriais antes do início do tratamento com  $E_2+P_4+ cAMP$  (CTRL); B. Células estromais endometriais no segundo dia de tratamento (D2); C. Células estromais endometriais no quarto dia de tratamento (D4). D. Células estromais endometriais no sexto dia de tratamento (D6). E. Células estromais endometriais no oitavo dia de tratamento (D8).

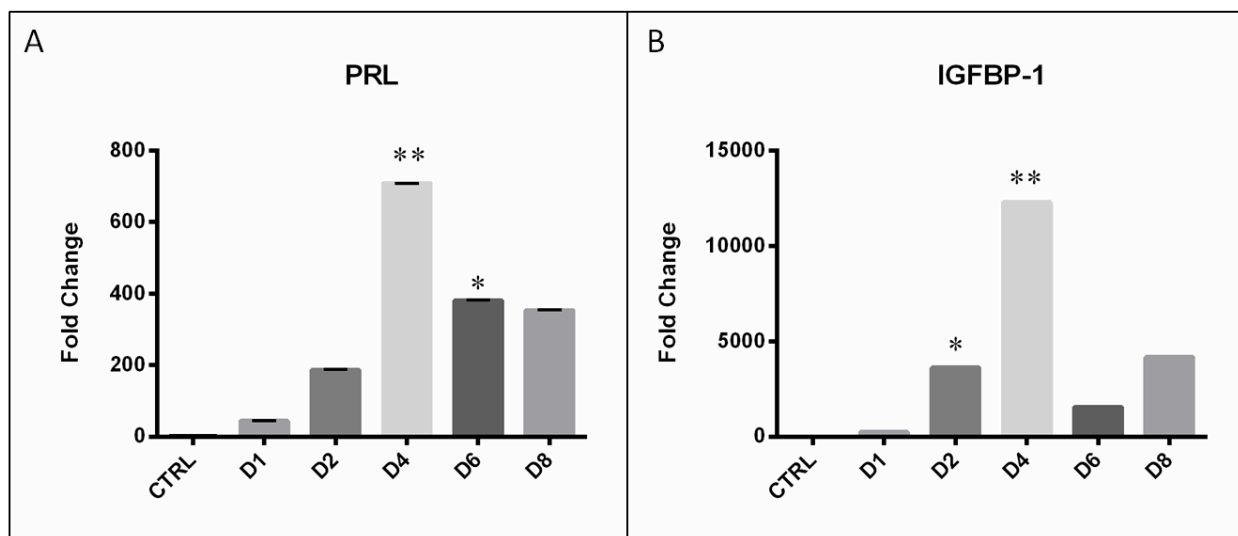


Gráfico 5 – Expressão gênica da Prolactina (A) e IGFBP-1 (B) durante o processo de decidualização. ANOVA de Friedman,  $p < 0,001$  para prolactina e  $p < 0,005$  para IGFBP1. Teste de Dunn: \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$

Quando avaliada por RT-PCR quantitativo e por Western Blot, a expressão gênica e proteica do Nodal não se mostrou alterada durante o processo de decidualização “*in vitro*” (Gráfico 6,  $p > 0,05$ , Figura 6,  $p > 0,05$ ).

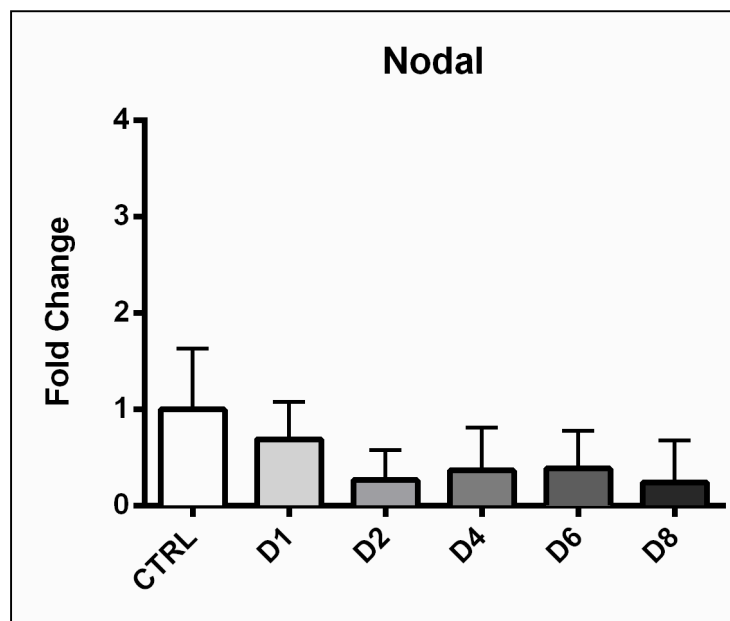


Gráfico 6 – Expressão gênica do Nodal durante o processo de decidualização “*in vitro*” ( $n=4$ ). ANOVA de Friedman,  $p > 0,05$ .

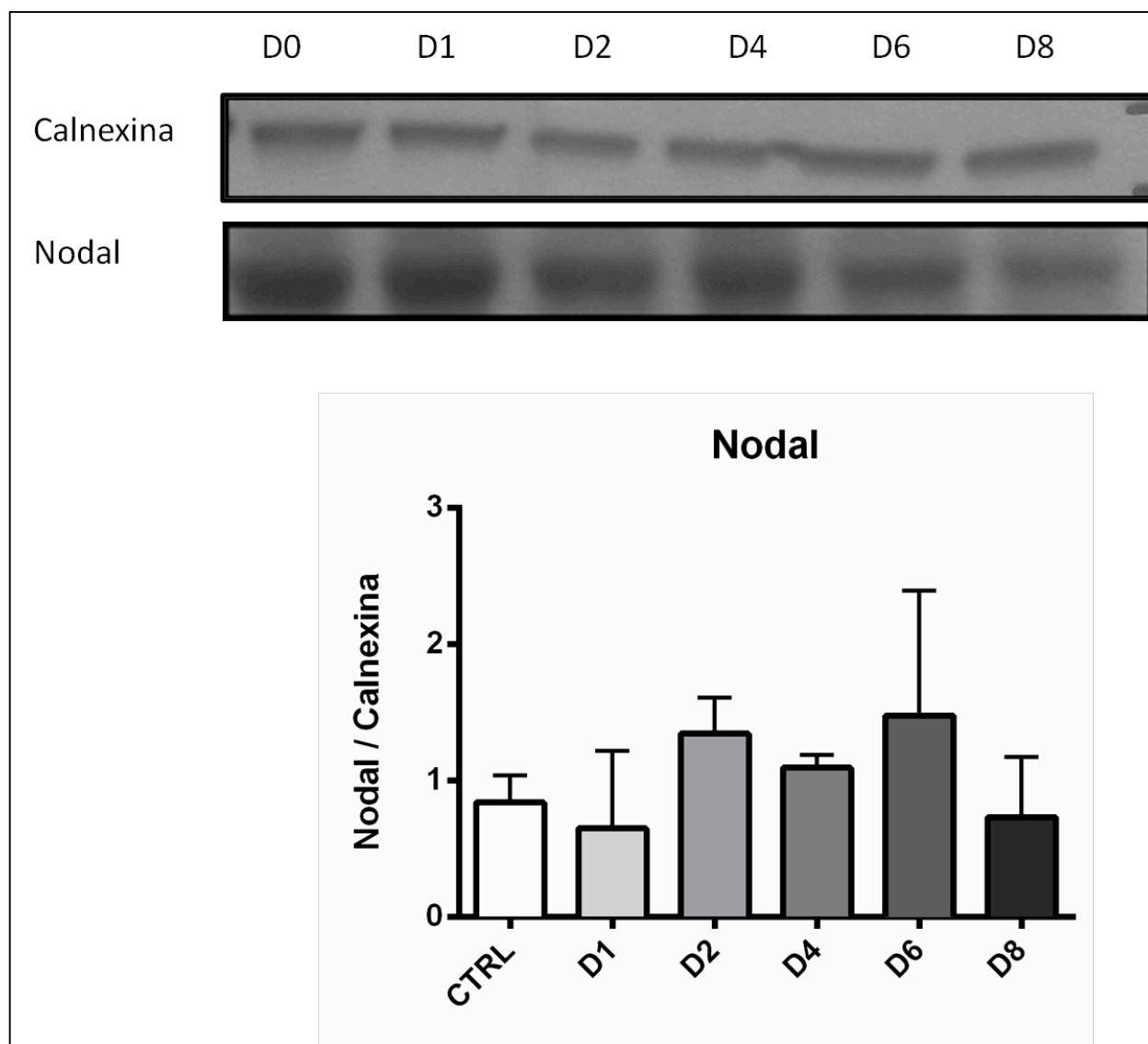


Figura 6 - Expressão proteica do Nodal em células estromais endometriais, tratadas ou não com o coquetel de decidualização (E<sub>2</sub>+P<sub>4</sub>+ cAMP) por 8 dias (n=4). A banda de expressão da Calnexina foi observada em ~75 kDa e a do Nodal em ~ 40kDa. A calnexina foi utilizada como controle interno. ANOVA de Friedman, p > 0,05.

A expressão do gene para o Cripto também foi avaliada durante o processo de decidualização “*in vitro*” e foi possível observar uma diminuição na sua expressão gênica de Cripto nos dias 2 e 8 desse processo (Gráfico 7, p < 0,04).

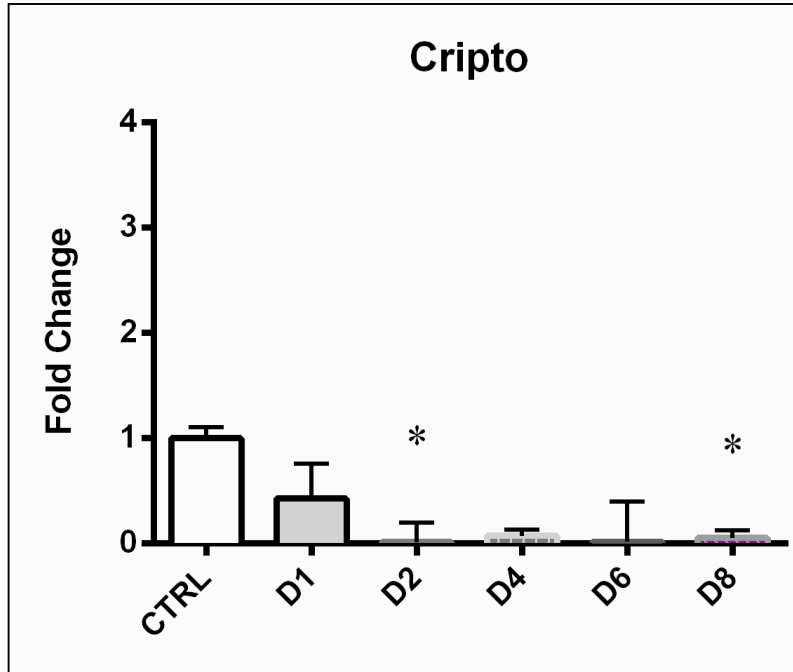


Gráfico 7 – Expressão gênica do Cripto durante o processo de decidualização “*in vitro*” (n=4). ANOVA de Friedman,  $p > 0,04$ .

## 5.2) Experimento “*in situ*”

A expressão gênica e proteica do Nodal no endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose foi avaliado por RT-PCR e Western Blot. Não foi encontrada diferença na expressão dessa molécula utilizando essas técnicas (Gráfico 8 e Figura 7,  $p > 0,05$ ).

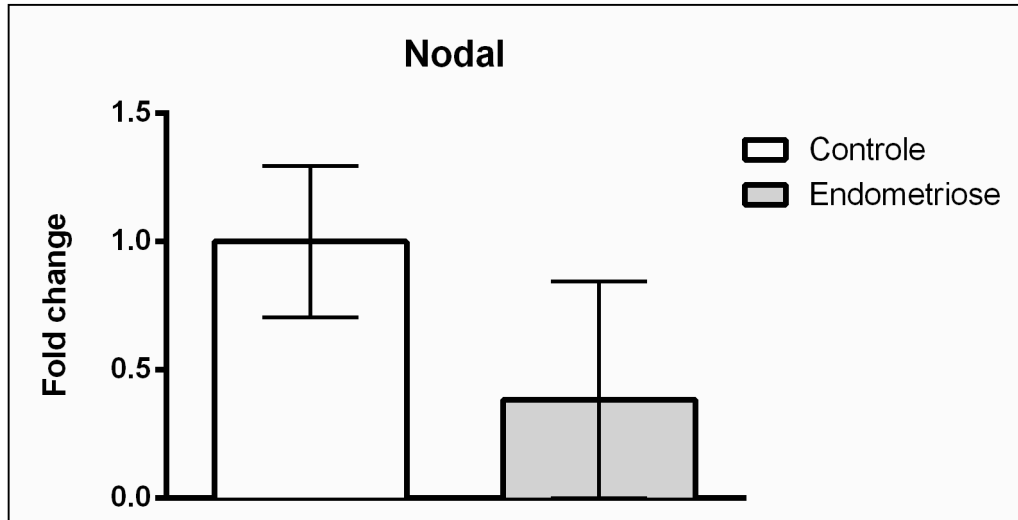


Gráfico 8 – Expressão gênica do Nodal no endométrio eutópico do grupo controle (sem endometriose) (n=10) e no grupo endometriose (n=9). Teste de Mann-Whitney,  $p > 0,05$ .



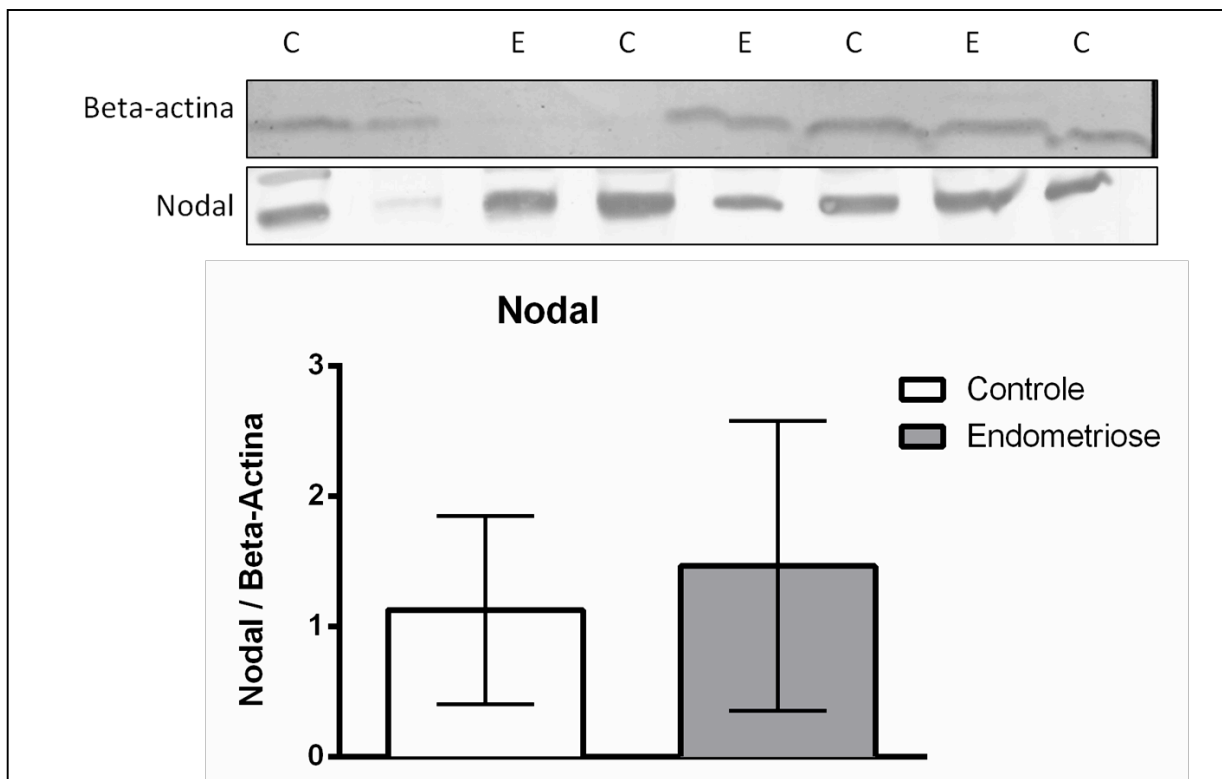


Figura 7 – Expressão proteica do Nodal no endométrio eutópico do grupo controle (sem endometriose) (n=10) e no endométrio eutópico de mulheres com endometriose (n=9). C= controle; E = endometriose. A banda de expressão da Beta-Actina foi observada em ~ 40 kDa e a do Nodal em ~ 42kDa. A beta-actina foi utilizada como controle interno. Teste de Mann-Whitney,  $p > 0,05$ .

Quando avaliada por RT-PCR, a expressão gênica de Cripto se mostrou diminuída no endométrio eutópico de mulheres com endometriose (Gráfico 9,  $p = 0,03$ ), no entanto essa diminuição não foi mantida quando avaliamos a expressão proteica dessa molécula no mesmo tecido (Figura 8,  $p > 0,05$ ).

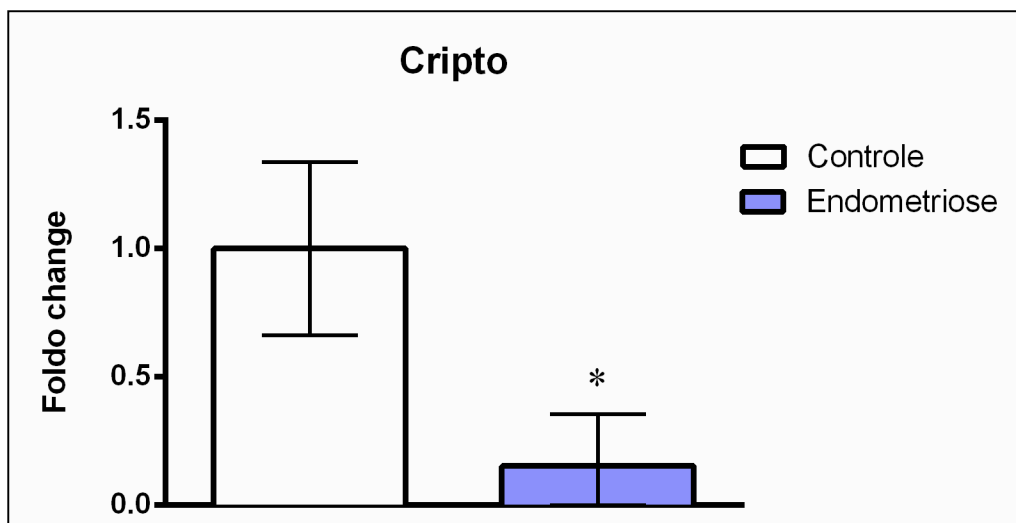


Gráfico 9 – Expressão gênica do Cripto no endométrio eutópico do grupo controle (sem endometriose) (n=10) e no grupo endometriose (n=9). Teste de Mann-Whitney, p = 0,03.

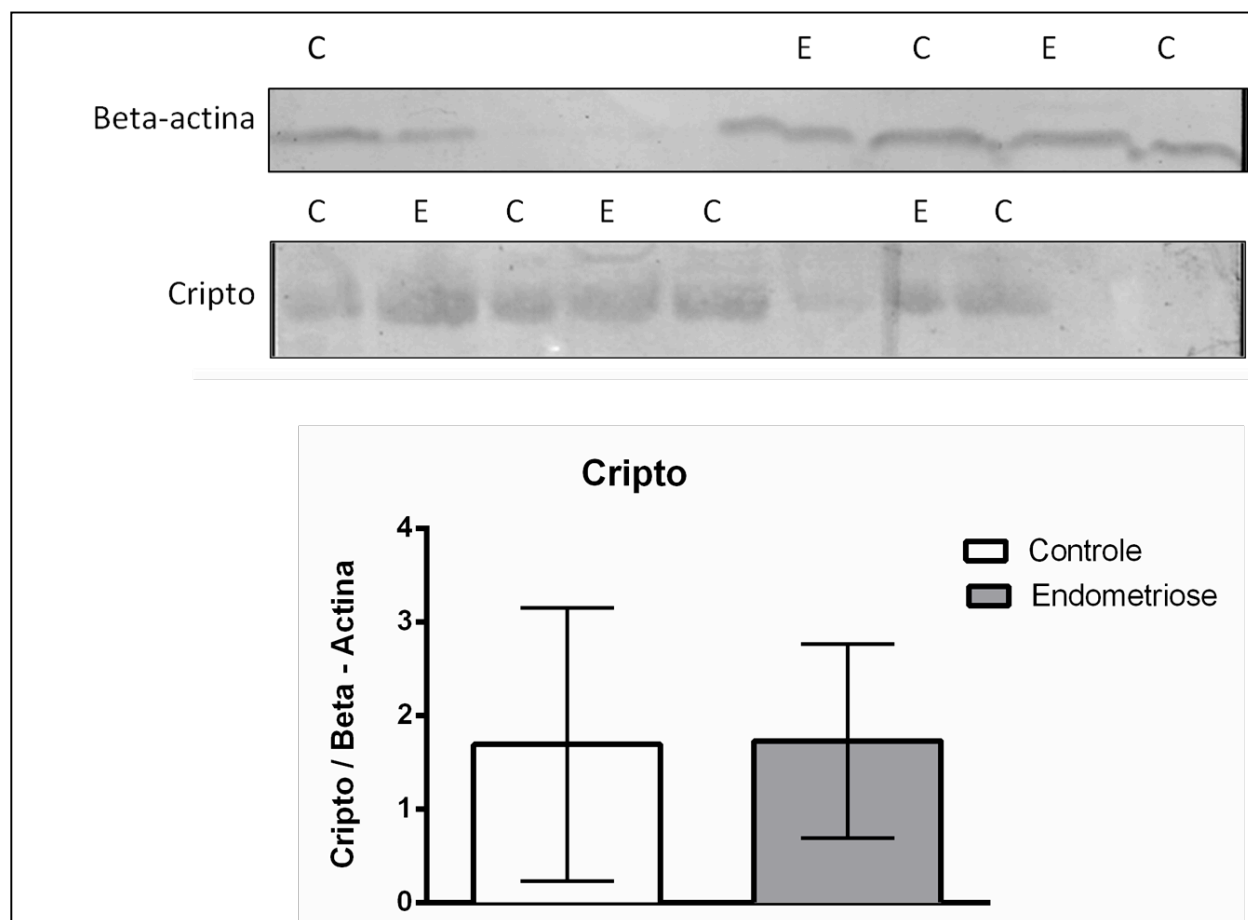


Figura 8 - Expressão proteica do Criptol no endométrio eutópico do grupo controle (sem endometriose) (n=10) e no endométrio eutópico de mulheres com endometriose (n=9). C= controle; E = endometriose. A banda de expressão da Beta-Actina foi observada em ~ 40 kDa e a do Criptol em ~ 21 kDa. A beta-actina foi utilizada como controle interno. Test t,  $p > 0,05$ .

Após a avaliação do Nodal e do seu co-receptor Cripto, iniciamos a avaliação dos sinalizadores intracelulares da sua via de transdução de sinal. A expressão gênica e proteica da Smad 3 foi analisada por RT-PCR e por imunohistoquímica.

Não foi encontrada nenhuma alteração na expressão gênica da Smad 3 (Gráfico 10,  $p > 0,05$ ) quando comparamos a sua expressão no endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose, no entanto encontramos uma diminuição na sua imunomarcagem no endométrio eutópico de mulheres com endometriose (Gráfico 11,  $p = 0,01$ ). A proteína Smad 3 se mostrou expressa na superfície epitelial, no epitélio glandular e no estroma do endométrio. Todas as

amostras se mostraram positivas, e conforme o esperado ela apresentou um padrão de expressão citoplasmático e nuclear (Figura 9)

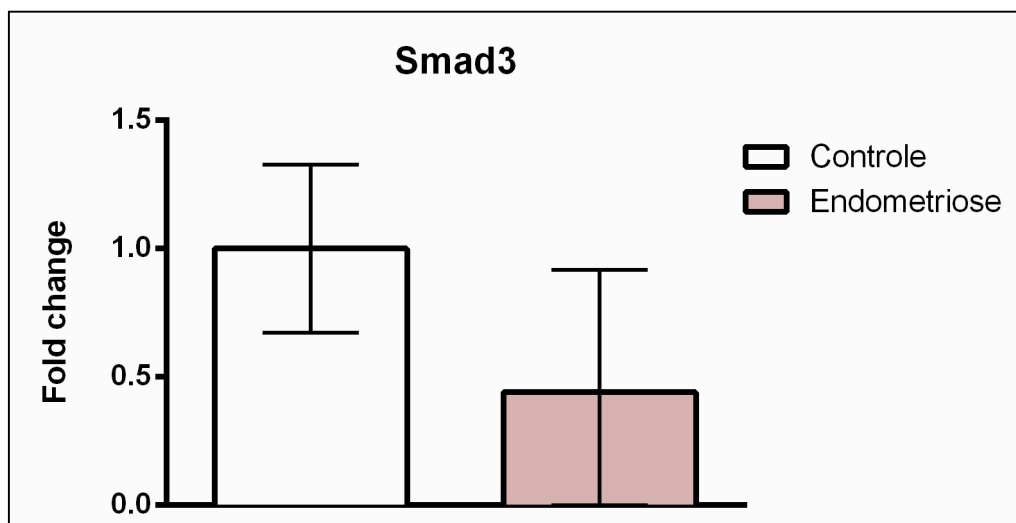


Gráfico 10 – Expressão gênica da Smad 3 no endométrio eutópico do grupo controle (sem endometriose) (n=10) e no grupo endometriose (n=9). Teste de Mann-Whitney,  $p > 0,05$ .

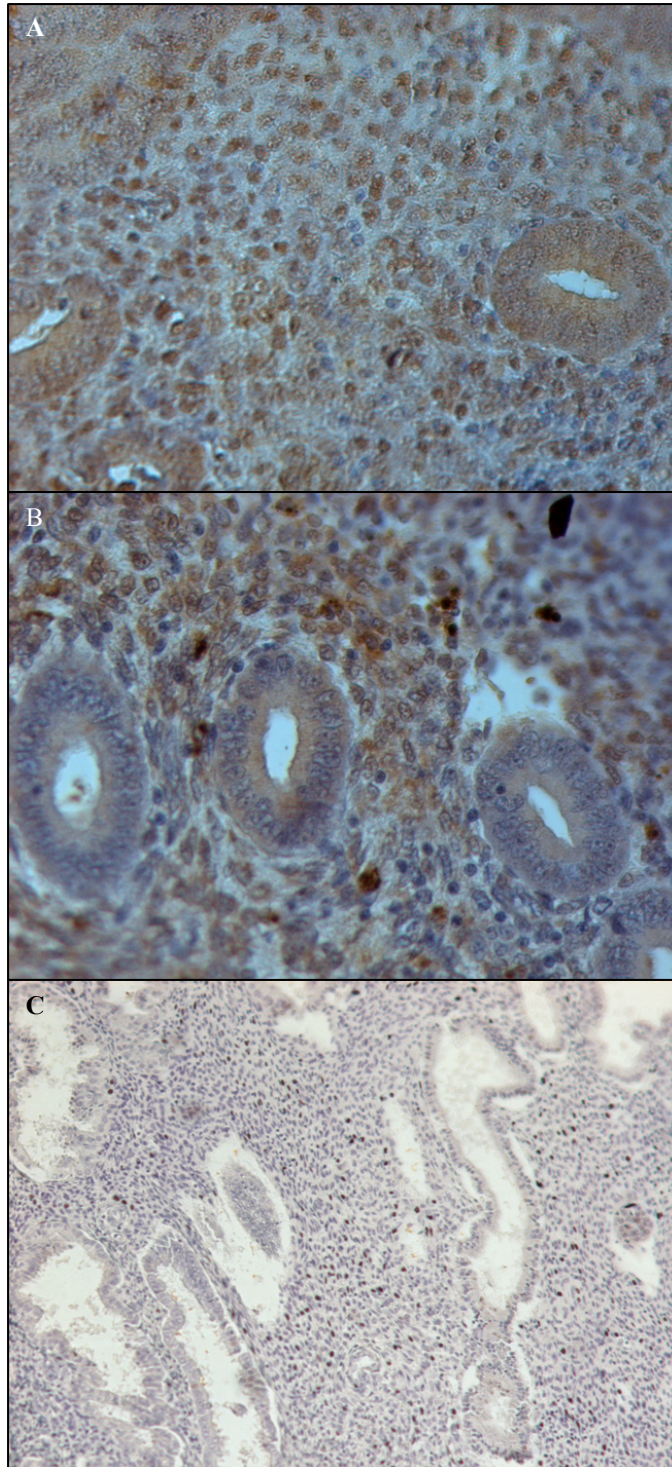


Figura 9 – Imunoreatividade da Smad 3 no endométrio eutópico do grupo controle (A), no endométrio eutópico de mulheres com endometriose (B), controle negativo (C).

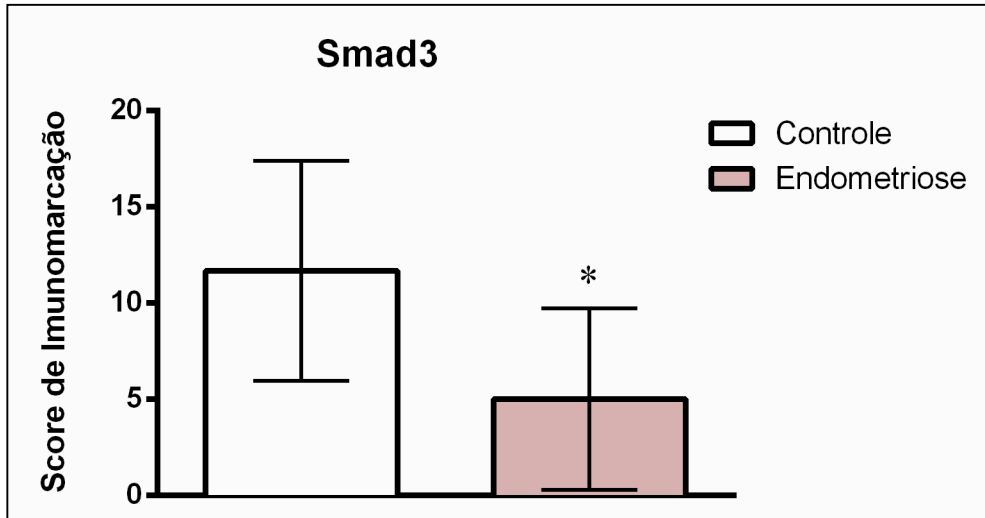


Gráfico 11 – Score de imunomarcção da Smad 3 no endométrio eutópico do grupo controle (sem endometriose) (n=10) e no grupo endometriose (n=9). Teste de Mann-Whitney,  $p = 0,01$ .

A expressão proteica da Smad 3 fosforilada foi analisada por imunohistoquímica. Essa proteína se mostrou expressa na superfície epitelial, no epitélio glandular e no estroma. A sua expressão não foi detectada em duas amostras do grupo endometriose. Conforme o esperado, o seu perfil de marcação foi citoplasmático e nuclear (Figura 11). Não foi encontrada diferença na sua imunomarcção quando comparamos o endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose (Gráfico 12,  $p > 0,05$ ).

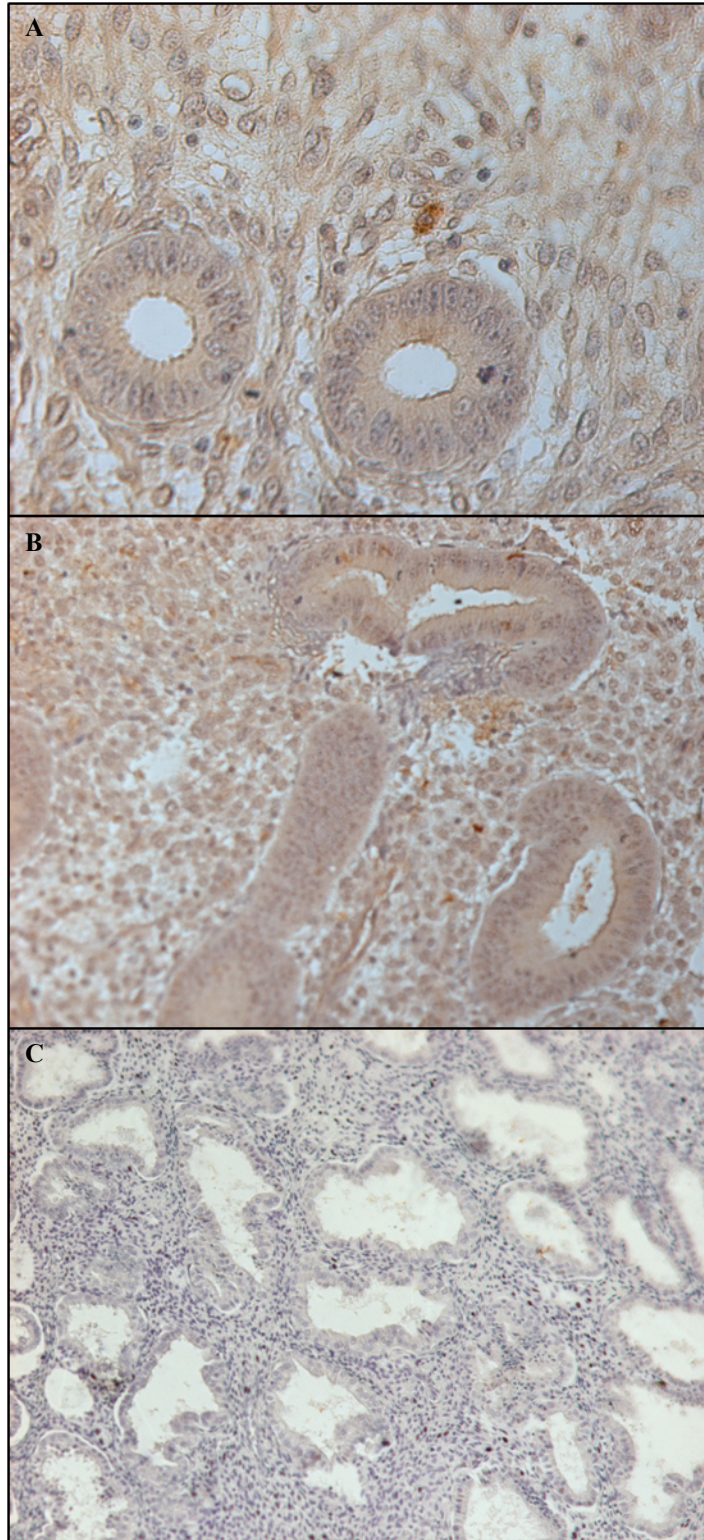


Figura 10 – Imunoreatividade da Smad 3 fosforilada no endométrio eutópico do grupo controle (A), no endométrio eutópico de mulheres com endometriose (B), controle negativo (C).

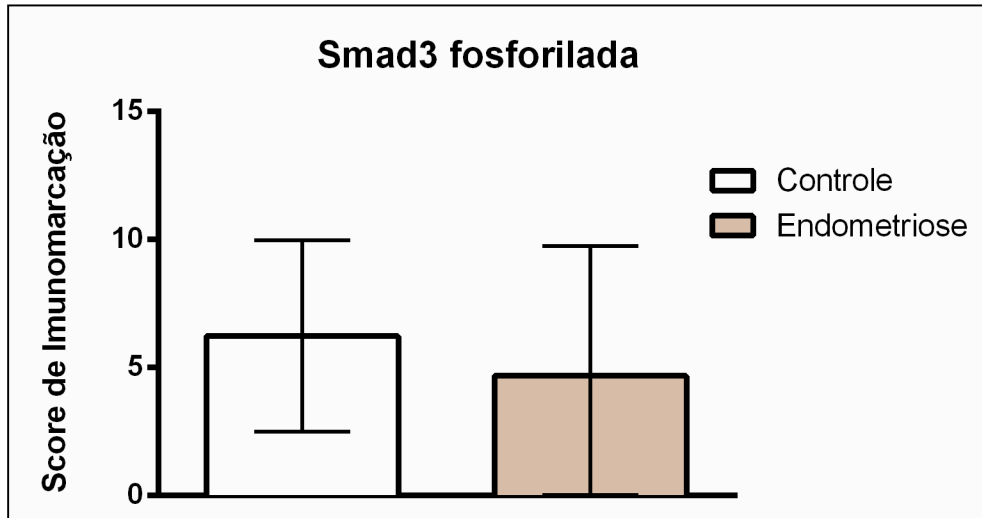


Gráfico 12 – Score de imunomarcção da Smad 3 fosforilada no endométrio eutópico do grupo controle (sem endometriose) (n=10) e no grupo endometriose (n=9) . Mann – Whitney test,  $p > 0,05$ .

Como último mediador da cascata de sinalização do Nodal e de outros membros da família TGF-beta, antes da transcrição de genes alvo, a expressão gênica e proteica da Smad 4 foi avaliada por RT-PCR e por imunohistoquímica. Não foi encontrada diferença na expressão gênica da Smad 4 no endométrio eutópico de mulheres com endometriose (Gráfico 11,  $p > 0,05$ ). A proteína Smad 4 se mostrou expressa na superfície epitelial, no epitélio glandular e no estroma. Todas as amostras avaliadas se mostraram positivas, e conforme o esperado, a Smad 4 apresentou uma marcação citoplasmática e nuclear (Figura 12). Devido à importância da presença dessa molécula no núcleo celular, para a análise de imunohistoquímica foi analisada apenas a porcentagem de marcação nuclear. Não foi encontrada diferença estatística na porcentagem de núcleos marcados por essa proteína, como demonstrado no Gráfico 13,  $p > 0,05$ .



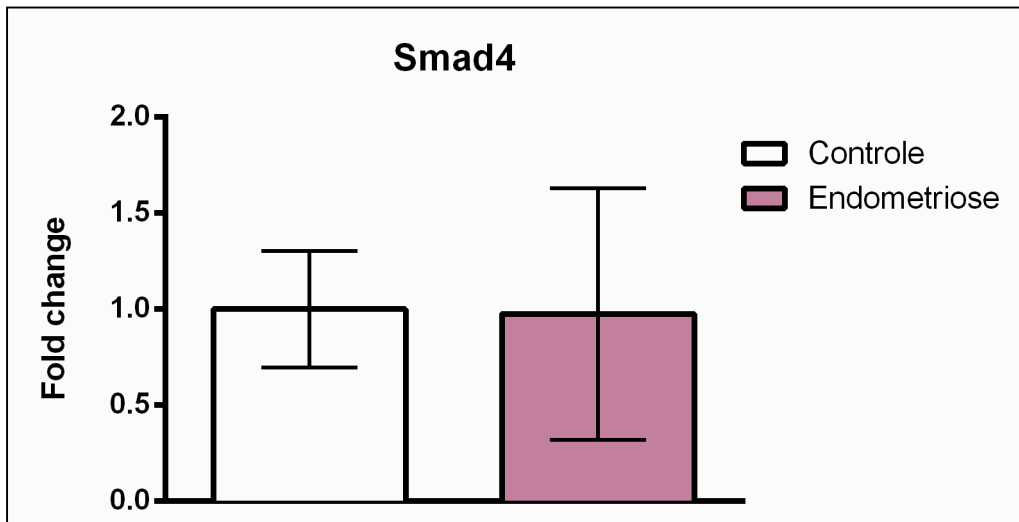


Gráfico 13 – Expressão gênica da Smad 4 no endométrio eutópico do grupo controle (sem endometriose) (n=10) e no grupo endometriose (n=9). Teste de Mann-Whitney,  $p > 0,05$ .

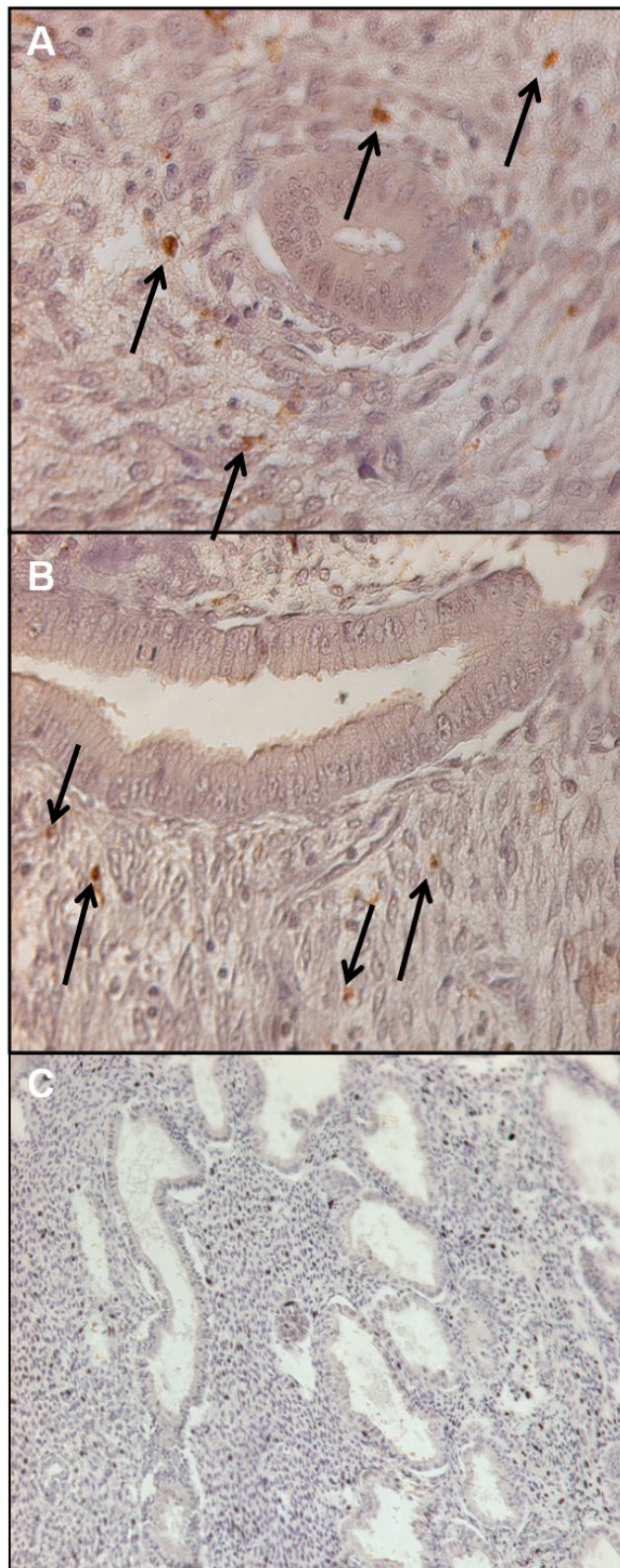


Figura 11 – Imunoreatividade da Smad 4 no endométrio eutópico do grupo controle (A), no endométrio eutópico de mulheres com endometriose (B), controle negativo (C). —> marcação nuclear.

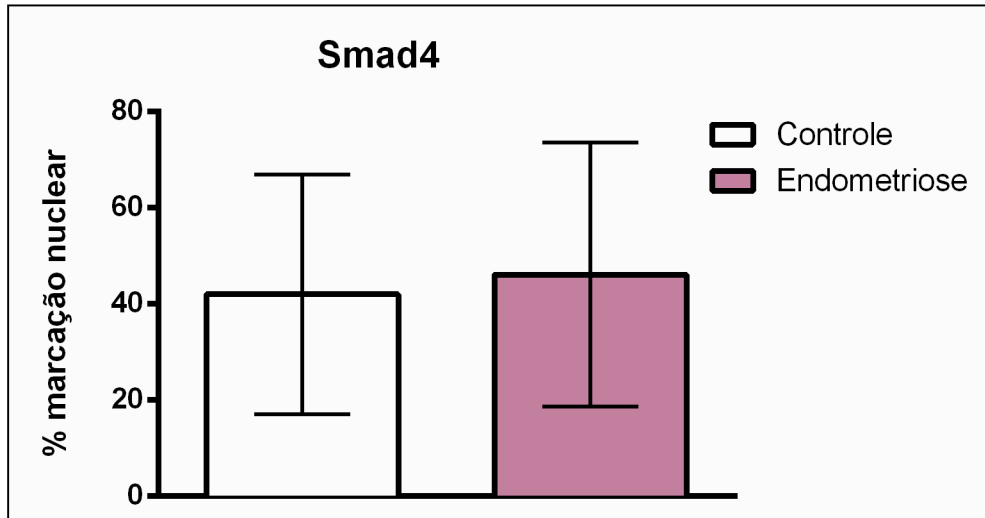


Gráfico 14 – Porcentagem de marcação nuclear da Smad 4 no endométrio eutópico do grupo controle (sem endometriose) (n=10) e no grupo endometriose (n=9). Teste de Mann-Whitney,  $p > 0,05$ .

## 6) Discussão

O nosso primeiro passo para avaliar a via de sinalização do Nodal no endométrio, e posteriormente fazer a sua correlação com a fisiopatologia da endometriose, foi estudar se os principais membros dessa via seriam regulados pelos hormônios estrógeno e progesterona. Para isso, as hESCs foram cultivadas e tratadas ou não por 24 horas, com Estrógeno, Progesterona, Estrógeno + Progesterona e Estrógeno + Progesterona + cAMP. Foram analisadas as expressões gênicas do Nodal, do Cripto, da Smad 4 e da Smad 7, e a expressão proteica do Nodal.

Nossos resultados mostraram que a expressão gênica do Nodal não foi alterada sob nenhum tratamento feito. O que pode ser observado foi que a expressão do gene dessa molécula foi aparentemente aumentando de acordo com o estímulo hormonal, principalmente da associação de Estrógeno + Progesterona, embora nenhuma diferença estatisticamente significativa tenha sido encontrada. Adicionalmente, esse comportamento da expressão gênica do Nodal não foi mantido quando o cAMP foi adicionado a essa combinação. Corroborando a hipótese de que os hormônios esteroides regulariam a expressão gênica de Nodal, nós encontramos um aumento significativo na expressão proteica de Nodal quando as células foram tratadas com Estrógeno + Progesterona, e mais uma vez esse perfil de expressão foi perdido quando a essa combinação hormonal foi adicionado o cAMP.

Até o nosso conhecimento, nenhum estudo avaliou a ação dos esteroides ovarianos na expressão do Nodal em culturas de células estromais endometriais humanas. A expressão gênica do Nodal foi avaliada durante o ciclo menstrual em dois trabalhos e, em ambos, os autores demonstraram que o gene do Nodal se mostrou expresso durante todo o ciclo menstrual, tendo o seu pico de expressão na fase secretora inicial, sugerindo assim que suas ações são direcionadas tanto pela progesterona quanto pelo estrógeno (Papageorgiou *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2011). O presente estudo também foi o primeiro a avaliar a expressão proteica de Nodal sob a ação dos hormônios esteroides ovarianos e da associação deles com cAMP. Nossos achados indicaram que a sua expressão proteica está claramente aumentada na presença de estrógeno e progesterona. Os nossos resultados discordam do único

estudo no qual a expressão proteica de Nodal foi avaliada por imunohistoquímica, que demonstrou que a sua imunomarcção se mostrou forte durante toda a fase proliferativa no compartimento estromal do endométrio, e depois a sua imunoreatividade foi diminuída na fase secretora (Papageorgiou *et al.*, 2009).

Com relação ao Cripto, a sua expressão gênica não foi alterada quando as células foram tratadas com os hormônios esteroides ovarianos, embora ele tenha apresentado o mesmo perfil de expressão gênica do Nodal. Apesar de não termos encontrado nenhuma diferença estatisticamente significativa, pareceu haver uma diminuição na expressão gênica do Cripto quando o cAMP foi adicionado à combinação hormonal de Estrógeno + Progesterona. Nos dois estudos em que a expressão de Cripto foi avaliada durante o ciclo menstrual, em ambos ele se mostrou expresso durante todo o ciclo menstrual, no entanto em um estudo o seu pico de expressão foi na fase secretora do ciclo menstrual, o que sugeriu que suas ações foram mais direcionadas pela progesterona (Papageorgiou *et al.*, 2009) e contrariamente, no outro estudo ele apresentou o seu pico de expressão na fase proliferativa tanto inicial quanto tardia, e depois sua expressão caiu drasticamente na fase secretora do ciclo (Rocha *et al.*, 2011).

Não há outros dados a respeito da avaliação gênica e proteica de Nodal e Cripto no ciclo menstrual. Em outros estudos que investigaram as ações do estrógeno e da progesterona sobre a expressão de membros da família TGF-beta em células endometriais, verificou-se que o gene do TGF-beta 1 está ativado pelo receptor de estrógeno na presença de metabólitos ou antagonistas do estrogênio, e que a combinação de estrógeno com a progesterona estimula a expressão do seu gene (Kanzaki *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996; Casslen *et al.*, 1998). Por outro lado, a progesterona bloqueou a expressão de TGF-beta 1 em culturas com explantes de endométrio humano (Gaide Chevronnay *et al.*, 2008) e inibiu a secreção de TGF-beta 2 em células estromais endometriais humanas (Kanzaki *et al.*, 1995). Esses dados contradizem os estudos anteriores que relataram os efeitos estimulatórios da progesterona na expressão gênica de TGF-beta 2, e da ação combinada de progesterona e estradiol na expressão de TGF-beta 1. Embora os estudos

apresentados sejam contraditórios, devemos levar em consideração as doses dos hormônios utilizados, o tempo de tratamento, a fase do ciclo e outros fatores. Diante dos indícios apresentados, é importante considerar que os hormônios esteroides ovarianos desempenham um importante efeito sobre a ação e secreção de membros da família TGF-beta, o que reforça a hipótese de que o Nodal e membros da sua via de sinalização podem estar envolvidos em eventos reprodutivos fisiológicos e patológicos.

Membros da família TGF-beta têm suas ações mediadas desde a membrana celular até o núcleo através de receptores e da ativação de mediadores intracelulares específicos, como as proteínas Smads (Zimmerman e Padgett, 2000; Moustakas, Souchelnytskyi e Heldin, 2001). Uma vez que os esteroides ovarianos regulam a expressão de citocinas da família TGF-beta em tecidos sensíveis a hormônios, como é o caso do endométrio, eles poderiam também influenciar a expressão das Smads (Luo, Xu e Chegini, 2003). Nossos dados mostraram que a progesterona exerceu uma regulação positiva sobre a expressão gênica da Smad 4 e da Smad 7. A Smad 4 ocupa uma posição central na via de sinalização de todos os ligantes da família TGF-beta, sendo responsável pela maior parte das respostas biológicas ativadas por esse mecanismo (Wakefield e Hill, 2013).

Os ligantes da família TGF-beta induzem a fosforilação da Smad 3, a qual ativa a Smad 4 e a transloca para o núcleo, regulando assim a transcrição de inúmeros genes (Wu *et al.*, 2003). A Smad 7 é um importante regulador da sinalização do TGF-beta, da Ativina, do Nodal e do BMP através do feedback negativo, e medeia as reações entre essas citocinas e outras vias de sinalização. Ela também desempenha um papel importante em processos patológicos e apresenta ações tanto anti-fibróticas quanto anti-inflamatórias, sugerindo que sua expressão exacerbada poderia ser um alvo terapêutico (Yan, Liu e Chen, 2009). Embora a alteração encontrada com relação à expressão proteica de Nodal não tenha sido sob a ação somente da progesterona, o aumento encontrado na expressão gênica da Smad 4 e da Smad 7 demonstrou que a via das Smads está ativada e que elas são reguladas por hormônios ovarianos, e que o fato de ambas se mostrarem aumentadas, mesmo apresentando ações biológicas opostas, indica que esse sistema possuiu um mecanismo de feedback auto-regulatório

que equilibra as ações dos membros da família TGF-beta no endométrio (Luo, Xu e Chegini, 2003).

O estudo “*in vitro*”, utilizando células estromais endometriais nos mostrou que todas as moléculas avaliadas envolvidas com a via de sinalização do Nodal são expressas pelas células estromais do endométrio, e que esse mecanismo de transdução de sinal é regulado por hormônios esteroides, pelo menos nessas células. A descoberta dessa regulação reforça a nossa hipótese de que a via de sinalização do Nodal poderia ter uma papel regulatório na fisiopatologia da endometriose. Nosso passo seguinte foi avaliar o perfil temporal de expressão desses dois membros da família TGF-beta no processo de decidualização, o que também estaria relacionado com a endometriose, uma vez que a infertilidade nas mulheres que apresentam essa doença poderia estar associada a uma falha na decidualização devido a resistência a progesterona (Macer e Taylor, 2012).

O real impacto e como o mecanismo da infertilidade acontece na endometriose ainda é alvo de muitos estudos (Kuohung *et al.*, 2002; Practice Committee of the American Society for Reproductive, 2012), no entanto pesquisas indicam que o endométrio eutópico das mulheres com endometriose apresenta uma diminuição na expressão de citocinas e fatores de crescimentos chave para a receptividade do útero, além da via dos hormônios esteroides também estar alterada, o que prove uma explicação lógica tanto para os problemas associados à infertilidade quanto para a própria fisiopatologia da doença (Holoch e Lessey, 2010).

O endométrio uterino é um órgão dinâmico que sofre crescimento, remodelamento e descamação sob o controle hormonal. A decidualização das células endometriais, as quais desenvolvem no final da fase secretora do ciclo menstrual, é caracterizada por alterações morfológicas e diferenciação funcional (Kim *et al.*, 2005). Para que a implantação ocorra, o endométrio precisa primeiramente estar morfológicamente preparado para receber o blastocisto que irá se implantar na parede uterina (Ramathal *et al.*, 2010; Park e Dufort, 2013). Embora esse processo seja regulado por hormônios, estudos têm indicado que outros fatores, como citocinas e fatores de crescimentos são também essenciais para o processo de decidualização das

células estromais (Stoikos *et al.*, 2008). Nós avaliamos a expressão a expressão gênica e proteica de Nodal durante o processo de decidualização “*in vitro*” e verificamos que o Nodal foi expresso em todas as amostras analisadas. Em um estudo anterior que avaliou a expressão de vários membros da família TGF-beta em células endometriais estromais cultivadas “*in vitro*”, a expressão do Nodal não foi detectada nas células inicialmente isoladas e nem naquelas decidualizadas (Stoikos *et al.*, 2008). Esse resultado contrasta com os nossos achados, no entanto foram utilizadas técnicas mais sensíveis no presente estudo (PCR em tempo real e western blot) em comparação com o estudo anterior, que valeu-se de PCR convencional.

O presente estudo também avaliou a expressão do co-receptor do Nodal, o Cripto, durante o processo de decidualização. Os resultados apresentados até momento mostram que o perfil de expressão do Cripto acompanhou o do Nodal, e isso era o esperado pelo fato do Cripto ser essencial para via de sinalização do Nodal. No entanto, quando a expressão gênica do Cripto foi avaliada durante a decidualização “*in vitro*”, foi possível observar uma diminuição na sua expressão nos dias 2 e 8 da decidualização. Diferentemente da Ativina e de outros membros da família TGF-beta, o Nodal é o único membro que requer o Cripto para a sua via de sinalização (Park e Dufort, 2011; 2013; Quail *et al.*, 2013). Estudos têm sugerido que o Cripto poderia interagir diretamente com o receptor tipo I da ativina (ALK 4), independentemente da presença de Nodal, podendo assim ser autonomicamente ativado e bloquear as ações da Ativina (Rosa, 2002; Harrison *et al.*, 2005). Pesquisadores não detectaram a ligação da Ativina ao Cripto na ausência dos receptores do ActRIIA e ActRIIB, sugerindo que Ativina, diferentemente do Nodal, precisa dos ActRIIs para se ligar ao Cripto. Os resultados encontrados por esses pesquisadores apoiam o mecanismo pelo qual o Cripto se liga ao complexo Ativina-ActRIIA/B e inibe a sinalização subsequente via ALK 4 (Gray, Harrison e Vale, 2003) . Em outro estudo em que o antagonismo do Cripto foi avaliado, pesquisadores propuseram que a ligação independente do Cripto ao ALK 4, ou a formação do complexo Ativina, ALK 4 e Cripto seria suficiente para inibir as ações da Ativina (Adkins *et al.*, 2003).

Todos esses achados com relação ao antagonismo do Cripto dão suporte aos



resultados aqui encontrados com relação à diminuição da sua expressão gênica no período da decidualização, uma vez que estudos demonstraram que a expressão das subunidades da Ativina está claramente aumentada durante a decidualização, tanto em modelos “*in vivo*” quanto “*in vitro*” (Jones *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2006). Adicionalmente, mais pesquisas para avaliar o real papel do Cripto no processo de decidualização são necessárias a fim de elucidar se essa diminuição também é refletida a níveis proteicos, se as alterações encontradas a níveis de células estromais refletem os dados do tecido endometrial como todo, e se essa inibição encontrada na expressão gênica do Cripto aconteceu pela diferenciação celular e não por uma ação aguda da progesterona durante o processo de decidualização.

Para então concluir nossos objetivos, e fazer a correlação do Nodal e dos membros relacionados ao seu mecanismo de transdução de sinal com a fisiopatologia da endometriose, foi avaliada a expressão gênica e proteica do Nodal, do Cripto, da Smad 3 e da Smad 4, e a expressão proteica da Smad 3 fosforilada no endométrio eutópico de mulheres com e sem a doença na fase proliferativa do ciclo menstrual. No presente estudo nós não avaliamos o perfil de expressão dos membros da via de sinalização do Nodal na fase secretora do ciclo, o que não nos permite comparar os dados obtidos em tecido com os dados encontrados no processo de decidualização celular “*in vitro*”.

Alterações na sinalização de membros da família TGF-beta têm sido associadas com câncer, doenças renais e vasculares (Border e Noble, 1994; Bruijn *et al.*, 1994). Embora mutações em vários componentes desta via possam ser os responsáveis por várias anormalidades, tem se mostrado que a sinalização dos membros dessa família pode ser fortemente afetada por interações feitas com outras moléculas na célula (Matsuda *et al.*, 2001). Estudos têm mostrado a interação de um grande número de proteínas intracelulares com as Smads, influenciando assim a sinalização das citocinas da família TGF-beta (Matsuda *et al.*, 2001; Miyazono, Kusanagi e Inoue, 2001). Enquanto algumas dessas citocinas tem se mostrado ativadoras das Smads outras são repressoras das suas atividades (Matsuda *et al.*, 2001). Também os hormônios esteroides podem influenciar a sinalização do TGF-beta tanto positivamente quanto

negativamente e assim exercer impacto em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos (Pierce *et al.*, 1989; Lei *et al.*, 1998; Silbiger *et al.*, 1998), como a endometriose.

Os dados obtidos no presente estudo com relação à expressão gênica de Nodal e Cripto corroboram os achados de estudos anteriores, em que os níveis de mRNA do Nodal e do Cripto foram avaliados no endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose (Torres *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2011). Os nossos resultados mostraram que a expressão gênica do Nodal não se mostrou alterada no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e o gene do Cripto se mostrou diminuído no mesmo tecido. Embora o Nodal não tenha se mostrado expresso de uma forma aberrante no endométrio eutópico de mulheres com endometriose, a nossa hipótese era que a sua atividade biológica poderia estar aumentada, em função da menor expressão do seu co-receptor Cripto. Neste sentido, o nosso próximo passo foi analisar a expressão proteica do Nodal e do Cripto. Foi possível observar um discreto aumento na expressão proteica de Nodal no endométrio eutópico das mulheres com endometriose, o que sugeriu que embora esse aumento não fosse significativo, a diminuição na expressão gênica do Cripto estava sendo capaz de aumentar a atividade biológica do Nodal. Entretanto, a diminuição encontrada na expressão gênica do Cripto não correspondeu a alteração na sua expressão proteica no endométrio eutópico de mulheres com endometriose.

Uma vez que as ações de membros da família TGF- $\beta$  iniciam-se na membrana celular e terminam no núcleo, onde os seus receptores de membrana são responsáveis pela ativação de mediadores intracelulares específicos como as Smads, que são os principais membros da via de sinalização da família TGF- $\beta$  (Zimmerman e Padgett, 2000; Luo, Xu e Chegini, 2003), o passo a seguir foi estudar o perfil de expressão dessas moléculas no endométrio eutópico de mulheres com endometriose.

A expressão gênica da Smad 3 e Smad 4 foi avaliada por RT-PCR quantitativo, e a expressão proteica da Smad 3, Smad 3 fosforilada e Smad 4 foi avaliada através da imunohistoquímica no endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose. A única alteração que encontramos foi com relação ao escore de imunomarcagem da

Smad 3, que se mostrou diminuído no endométrio eutópico de mulheres com endometriose. Curiosamente pouco se tem estudado a respeito da relação entre as Smads e a endometriose. Até o nosso conhecimento só um trabalho avaliou apenas por imunohistoquímica a expressão da Smad 2, Smad 3 e Smad 4 no endométrio de mulheres sem endometriose e na endometriose ovariana e não foi encontrada nenhuma diferença da sua intensidade de marcação. Embora as pesquisas a respeito da relação entre as Smads e endometriose sejam escassas, estudos têm reportado que elas são supressoras da proliferação celular em vários tipos de tecido, incluindo o câncer (Mabuchi *et al.*, 2010). Alteração na expressão gênica da Smad 4 tem sido correlacionada à progressão de vários tipos de câncer, e está mais prevalente no câncer de pâncreas (Miyaki e Kuroki, 2003). Observou-se correlação entre o grau de invasão do câncer de mama e a diminuição da presença da Smad 3 nuclear (Jeruss *et al.*, 2003). Outros estudos indicaram que o receptor de estrogênio poderia suprimir a sinalização de membros da família TGF-beta por associar-se com e agir como um corepressor transcricional da Smad 3. Assim, a inibição da atividade da Smad 3 pelo receptor de estrogênio proveria um mecanismo molecular para os efeitos opostos do estrogênio e a sinalização dos TGF-betas em algumas doenças (Lei *et al.*, 1998; Silbiger *et al.*, 1998).

Diante disso, a diminuição na imunomarcagem da Smad 3 no endométrio eutópico de mulheres com endometriose poderia estar relacionada com esse efeito de oposição entre o estrogênio e a sinalização de membros da família TGF-beta. Neste sentido, o desequilíbrio observado na expressão gênica do Cripto pode ter sido responsável pela alteração encontrada na imunomarcagem da Smad 3. Embora esse pareça ser um sistema compensatório, por não termos encontrado alterações nas expressões proteicas de Nodal e Cripto, nossos dados sugerem que o sistema de sinalização do Nodal apresenta distorções no endométrio de mulheres com endometriose e que esse circuito molecular pode ser um potencial alvo terapêutico visando a restringir a proliferação das células endometrióticas.

## 7) Conclusões

Diante dos resultados obtidos podemos concluir que:

✓ O estímulo hormonal esteroide aumentou a expressão proteica de Nodal e a expressão gênica da Smad 4 e da Smad 7, sugerindo que a via de transdução do Nodal está ativada. O aumento encontrado na expressão gênica da Smad 4 e da Smad 7, mesmo apresentando ações biológicas opostas, indica que esse sistema possui um mecanismo de feedback que regula as ações Nodal nas células estromais sob ação dos hormônios esteroides;

✓ A diminuição na expressão gênica do Cripto sugere que no processo de decidualização das células estromais “*in vitro*” ele age como um antagonista das ações da ativina, no entanto mais pesquisas são necessárias para avaliar o papel do Cripto no processo de decidualização a fim de elucidar se essa diminuição também ocorre no nível proteico, se as alterações encontradas nas células estromais refletem os dados do tecido endometrial como todo, e se essa inibição da expressão gênica do Cripto aconteceu pela diferenciação celular ou por uma ação direta da progesterona durante o processo de decidualização;

✓ No endométrio eutópico de mulheres com endometriose encontramos uma diminuição na imunorreatividade da Smad 3. Os resultados obtidos sugerem que o desequilíbrio observado na expressão gênica de Cripto pode ter sido o responsável pela menor expressão da Smad 3 no endométrio eutópico das mulheres com endometriose;

✓ Por fim, nossos dados sugerem que a via de sinalização do Nodal apresenta distorções no endométrio eutópico de mulheres com endometriose, e que pode ser um potencial alvo terapêutico visando restringir a proliferação de células endometrióticas.

## Referências

- ADKINS, H. B. et al. Antibody blockade of the Cripto CFC domain suppresses tumor cell growth in vivo. **J Clin Invest**, v. 112, n. 4, p. 575-87, Aug 2003. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12925698> >.
- ALLAIRE, C. Endometriosis and infertility: a review. **J Reprod Med**, v. 51, n. 3, p. 164-8, Mar 2006. ISSN 0024-7758 (Print) 0024-7758 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16674010> >.
- BATTERSBY, S. et al. Temporal expression and signalling of prostacyclin receptor in the human endometrium across the menstrual cycle. **Reproduction**, v. 127, n. 1, p. 79-86, Jan 2004. ISSN 1470-1626 (Print) 1470-1626 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15056772> >.
- BELO, J. A. et al. Generating asymmetries in the early vertebrate embryo: the role of the Cerberus-like family. **Int J Dev Biol**, v. 53, n. 8-10, p. 1399-407, 2009. ISSN 1696-3547 (Electronic) 0214-6282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19247954> >.
- BENAGIANO, G.; BROSENS, I. The history of endometriosis: identifying the disease. **Hum Reprod**, v. 6, n. 7, p. 963-8, Aug 1991. ISSN 0268-1161 (Print) 0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1761667> >.
- BERKLEY, K. J.; RAPKIN, A. J.; PAPKA, R. E. The pains of endometriosis. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1587-9, Jun 10 2005. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15947176> >.
- BIANCO, C. et al. Cripto-1 activates nodal- and ALK4-dependent and -independent signaling pathways in mammary epithelial Cells. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 8, p. 2586-97, Apr 2002. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11909953> >.
- BORDER, W. A.; NOBLE, N. A. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. **N Engl J Med**, v. 331, n. 19, p. 1286-92, Nov 10 1994. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7935686> >.
- BRANDENBERGER, R. et al. Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation. **Nat Biotechnol**, v. 22, n. 6, p. 707-16, Jun 2004. ISSN 1087-0156 (Print) 1087-0156 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15146197> >.

BRENNAN, J.; NORRIS, D. P.; ROBERTSON, E. J. Nodal activity in the node governs left-right asymmetry. **Genes Dev**, v. 16, n. 18, p. 2339-44, Sep 15 2002. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12231623> >.

BRUIJN, J. A. et al. Transforming growth factor-beta and the glomerular extracellular matrix in renal pathology. **J Lab Clin Med**, v. 123, n. 1, p. 34-47, Jan 1994. ISSN 0022-2143 (Print) 0022-2143 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8288959> >.

BULUN, S. E. Endometriosis. **N Engl J Med**, v. 360, n. 3, p. 268-79, Jan 15 2009. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144942> >.

BULUN, S. E. et al. Progesterone resistance in endometriosis: link to failure to metabolize estradiol. **Mol Cell Endocrinol**, v. 248, n. 1-2, p. 94-103, Mar 27 2006. ISSN 0303-7207 (Print) 0303-7207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16406281> >.

BURNEY, R. O.; GIUDICE, L. C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. **Fertil Steril**, v. 98, n. 3, p. 511-9, Sep 2012. ISSN 1556-5653 (Electronic) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22819144> >.

BYFIELD, S. D.; ROBERTS, A. B. Lateral signaling enhances TGF-beta response complexity. **Trends Cell Biol**, v. 14, n. 3, p. 107-11, Mar 2004. ISSN 0962-8924 (Print) 0962-8924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15055198> >.

CALVANESE, L. et al. Structural investigations on the Nodal-Cripto binding: a theoretical and experimental approach. **Biopolymers**, v. 93, n. 11, p. 1011-21, Nov 2010. ISSN 0006-3525 (Print) 0006-3525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20629020> >.

CASLEN, B. et al. Transforming growth factor beta1 in the human endometrium. Cyclic variation, increased expression by estradiol and progesterone, and regulation of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1. **Biol Reprod**, v. 58, n. 6, p. 1343-50, Jun 1998. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9623591> >.

CHEN, C.; SHEN, M. M. Two modes by which Lefty proteins inhibit nodal signaling. **Curr Biol**, v. 14, n. 7, p. 618-24, Apr 6 2004. ISSN 0960-9822 (Print) 0960-9822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15062104> >.

CHENG, S. K. et al. EGF-CFC proteins are essential coreceptors for the TGF-beta signals Vg1 and GDF1. **Genes Dev**, v. 17, n. 1, p. 31-6, Jan 1 2003. ISSN 0890-9369 (Print) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514096> >.

CICCODICOLA, A. et al. Molecular characterization of a gene of the 'EGF family' expressed in undifferentiated human NTERA2 teratocarcinoma cells. **EMBO J**, v. 8, n. 7, p. 1987-91, Jul 1989. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2792079> >.

CLOKE, B. et al. The androgen and progesterone receptors regulate distinct gene networks and cellular functions in decidualizing endometrium. **Endocrinology**, v. 149, n. 9, p. 4462-74, Sep 2008. ISSN 0013-7227 (Print)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18511503> >.

CRITCHLEY, H. O.; SAUNDERS, P. T. Hormone receptor dynamics in a receptive human endometrium. **Reprod Sci**, v. 16, n. 2, p. 191-9, Feb 2009. ISSN 1933-7205 (Electronic)

1933-7191 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19208787> >.

CURRY, T. E., JR.; OSTEEEN, K. G. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. **Endocr Rev**, v. 24, n. 4, p. 428-65, Aug 2003. ISSN 0163-769X (Print)

0163-769X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12920150> >.

DAHMOON, M. et al. Apoptosis, proliferation, and sex hormone receptors in superficial parts of human endometrium at the end of the secretory phase. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 84, n. 5, p. 1737-43, May 1999. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10323409> >.

DEY, S. K. et al. Molecular cues to implantation. **Endocr Rev**, v. 25, n. 3, p. 341-73, Jun 2004. ISSN 0163-769X (Print)

0163-769X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15180948> >.

DIMITRIADIS, E. et al. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. **Hum Reprod Update**, v. 11, n. 6, p. 613-30, Nov-Dec 2005. ISSN 1355-4786 (Print)

1355-4786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006437> >.

ESKENAZI, B.; WARNER, M. L. Epidemiology of endometriosis. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 24, n. 2, p. 235-58, Jun 1997. ISSN 0889-8545 (Print)

0889-8545 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9163765> >.

ETHIER, J. F.; FINDLAY, J. K. Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 667-75, May 2001. ISSN 1470-1626 (Print)

1470-1626 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11427154> >.

FINN, C. A. Menstruation: a nonadaptive consequence of uterine evolution. **Q Rev Biol**, v. 73, n. 2, p. 163-73, Jun 1998. ISSN 0033-5770 (Print)

0033-5770 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9618925> >.

GAIDE CHEVRONNAY, H. P. et al. Opposite regulation of transforming growth factors-beta2 and -beta3 expression in the human endometrium. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 1015-25, Mar 2008. ISSN 0013-7227 (Print)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039789> >.

GAO, J.; MAZELLA, J.; TSENG, L. Hox proteins activate the IGFBP-1 promoter and suppress the function of hPR in human endometrial cells. **DNA Cell Biol**, v. 21, n. 11, p. 819-25, Nov 2002. ISSN 1044-5498 (Print)

1044-5498 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12489992> >.

GELLERSEN, B.; BROSENS, J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. **J Endocrinol**, v. 178, n. 3, p. 357-72, Sep 2003. ISSN 0022-0795 (Print) 0022-0795 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12967329> >.

GIUDICE, L. C. Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevance to reproductive medicine. **Fertil Steril**, v. 61, n. 1, p. 1-17, Jan 1994. ISSN 0015-0282 (Print) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7507444> >.

GIUDICE, L. C.; KAO, L. C. Endometriosis. **Lancet**, v. 364, n. 9447, p. 1789-99, Nov 13-19 2004. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15541453> >.

GRAY, P. C.; HARRISON, C. A.; VALE, W. Cripto forms a complex with activin and type II activin receptors and can block activin signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 9, p. 5193-8, Apr 29 2003. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12682303> >.

HARRISON, C. A. et al. Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications. **Trends Endocrinol Metab**, v. 16, n. 2, p. 73-8, Mar 2005. ISSN 1043-2760 (Print) 1043-2760 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15734148> >.

HENDRIX, M. J. et al. Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 4, p. 246-55, Apr 2007. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17384580> >.

HENRIET, P.; GAIDE CHEVRONNAY, H. P.; MARBAIX, E. The endocrine and paracrine control of menstruation. **Mol Cell Endocrinol**, v. 358, n. 2, p. 197-207, Jul 25 2012. ISSN 1872-8057 (Electronic) 0303-7207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21820486> >.

HOLOCH, K. J.; LESSEY, B. A. Endometriosis and infertility. **Clin Obstet Gynecol**, v. 53, n. 2, p. 429-38, Jun 2010. ISSN 1532-5520 (Electronic) 0009-9201 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20436320> >.

HOOVER, L. L.; KUBALAK, S. W. Holding their own: the noncanonical roles of Smad proteins. **Sci Signal**, v. 1, n. 46, p. pe48, 2008. ISSN 1937-9145 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19018011> >.

HORNUNG, D. et al. Immunolocalization and regulation of the chemokine RANTES in human endometrial and endometriosis tissues and cells. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 5, p. 1621-8, May 1997. ISSN 0021-972X (Print) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9141560> >.

HOUSTON, D. E. Evidence for the risk of pelvic endometriosis by age, race and socioeconomic status. **Epidemiol Rev**, v. 6, p. 167-91, 1984. ISSN 0193-936X (Print) 0193-936X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6386501> >.



HUGHES, E. et al. Ovulation suppression for endometriosis. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, p. CD000155, 2007. ISSN 1469-493X (Electronic)  
1361-6137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17636607> >.

HUSBY, G. K.; HAUGEN, R. S.; MOEN, M. H. Diagnostic delay in women with pain and endometriosis. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 82, n. 7, p. 649-53, Jul 2003. ISSN 0001-6349 (Print)  
0001-6349 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12790847> >.

IRWIN, J. C. et al. Human endometrial matrix metalloproteinase-2, a putative menstrual proteinase. Hormonal regulation in cultured stromal cells and messenger RNA expression during the menstrual cycle. **J Clin Invest**, v. 97, n. 2, p. 438-47, Jan 15 1996. ISSN 0021-9738 (Print)  
0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8567965> >.

JERUSS, J. S. et al. Down-regulation of activin, activin receptors, and Smads in high-grade breast cancer. **Cancer Res**, v. 63, n. 13, p. 3783-90, Jul 1 2003. ISSN 0008-5472 (Print)  
0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12839974> >.

JONES, R. L. et al. Expression of activin receptors, follistatin and betaglycan by human endometrial stromal cells; consistent with a role for activins during decidualization. **Mol Hum Reprod**, v. 8, n. 4, p. 363-74, Apr 2002. ISSN 1360-9947 (Print)  
1360-9947 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11912285> >.

JONES, R. L. et al. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 217-32, Aug 2006. ISSN 1470-1626 (Print)  
1470-1626 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16885531> >.

JUBANYIK, K. J.; COMITE, F. Extrapelvic endometriosis. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 24, n. 2, p. 411-40, Jun 1997. ISSN 0889-8545 (Print)  
0889-8545 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9163774> >.

KANG, J. S.; LIU, C.; DERYNCK, R. New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function. **Trends Cell Biol**, v. 19, n. 8, p. 385-94, Aug 2009. ISSN 1879-3088 (Electronic)  
0962-8924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19648010> >.

KANZAKI, H. et al. Hormonal regulation in the production of macrophage colony-stimulating factor and transforming growth factor-beta by human endometrial stromal cells in culture. **Horm Res**, v. 44 Suppl 2, p. 30-5, 1995. ISSN 0301-0163 (Print)  
0301-0163 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7672777> >.

KAO, L. C. et al. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. **Endocrinology**, v. 144, n. 7, p. 2870-81, Jul 2003. ISSN 0013-7227 (Print)  
0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12810542> >.

KAO, L. C. et al. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. **Endocrinology**, v. 143, n. 6, p. 2119-38, Jun 2002. ISSN 0013-7227 (Print)  
0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12021176> >.

KIM, M. R. et al. Progesterone-dependent release of transforming growth factor-beta1 from epithelial cells enhances the endometrial decidualization by turning on the Smad signalling in stromal cells. **Mol Hum Reprod**, v. 11, n. 11, p. 801-8, Nov 2005. ISSN 1360-9947 (Print) 1360-9947 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16403803> >.

KOGER, K. E. et al. Surgical scar endometrioma. **Surg Gynecol Obstet**, v. 177, n. 3, p. 243-6, Sep 1993. ISSN 0039-6087 (Print) 0039-6087 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8356497> >.

KUMAR, A. et al. Nodal signaling uses activin and transforming growth factor-beta receptor-regulated Smads. **J Biol Chem**, v. 276, n. 1, p. 656-61, Jan 5 2001. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11024047> >.

KUOHUNG, W. et al. Characteristics of patients with endometriosis in the United States and the United Kingdom. **Fertil Steril**, v. 78, n. 4, p. 767-72, Oct 2002. ISSN 0015-0282 (Print) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372454> >.

LE GOOD, J. A. et al. Nodal stability determines signaling range. **Curr Biol**, v. 15, n. 1, p. 31-6, Jan 11 2005. ISSN 0960-9822 (Print) 0960-9822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15649361> >.

LEI, J. et al. Serum-stimulated alpha 1 type IV collagen gene transcription is mediated by TGF-beta and inhibited by estradiol. **Am J Physiol**, v. 274, n. 2 Pt 2, p. F252-8, Feb 1998. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486219> >.

LESSEY, B. A. Medical management of endometriosis and infertility. **Fertil Steril**, v. 73, n. 6, p. 1089-96, Jun 2000. ISSN 0015-0282 (Print) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10856462> >.

LESSEY, B. A. et al. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 67, n. 2, p. 334-40, Aug 1988. ISSN 0021-972X (Print) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2455728> >.

LI, Q. et al. WNT4 acts downstream of BMP2 and functions via beta-catenin signaling pathway to regulate human endometrial stromal cell differentiation. **Endocrinology**, v. 154, n. 1, p. 446-57, Jan 2013. ISSN 1945-7170 (Electronic) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23142810> >.

LIU, T.; FENG, X. H. Regulation of TGF-beta signalling by protein phosphatases. **Biochem J**, v. 430, n. 2, p. 191-8, Sep 1 2010. ISSN 1470-8728 (Electronic) 0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20704570> >.

LUO, X.; XU, J.; CHEGINI, N. The expression of Smads in human endometrium and regulation and induction in endometrial epithelial and stromal cells by transforming growth factor-beta. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 10, p. 4967-76, Oct 2003. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14557482> >.

MABUCHI, Y. et al. Immunohistochemical localization of inhibin and activin subunits, activin receptors and Smads in ovarian endometriosis. **Int J Mol Med**, v. 25, n. 1, p. 17-23, Jan 2010. ISSN 1791-244X (Electronic)

1107-3756 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19956897> >.

MACER, M. L.; TAYLOR, H. S. Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 39, n. 4, p. 535-49, Dec 2012. ISSN 1558-0474 (Electronic)

0889-8545 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23182559> >.

MARUYAMA, T.; YOSHIMURA, Y. Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. **Endocr J**, v. 55, n. 5, p. 795-810, Oct 2008. ISSN 1348-4540 (Electronic)

0918-8959 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18580040> >.

MASSAGUE, J. TGFbeta signalling in context. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 10, p. 616-30, Oct 2012. ISSN 1471-0080 (Electronic)

1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22992590> >.

MASSAGUE, J.; CHEN, Y. G. Controlling TGF-beta signaling. **Genes Dev**, v. 14, n. 6, p. 627-44, Mar 15 2000. ISSN 0890-9369 (Print)

0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10733523> >.

MASSAGUE, J.; GOMIS, R. R. The logic of TGFbeta signaling. **FEBS Lett**, v. 580, n. 12, p. 2811-20, May 22 2006. ISSN 0014-5793 (Print)

0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16678165> >.

MATSUDA, T. et al. Cross-talk between transforming growth factor-beta and estrogen receptor signaling through Smad3. **J Biol Chem**, v. 276, n. 46, p. 42908-14, Nov 16 2001. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11555647> >.

MISSMER, S. A. et al. Reproductive history and endometriosis among premenopausal women. **Obstet Gynecol**, v. 104, n. 5 Pt 1, p. 965-74, Nov 2004. ISSN 0029-7844 (Print)

0029-7844 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15516386> >.

MISSMER, S. A. et al. Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. **Am J Epidemiol**, v. 160, n. 8, p. 784-96, Oct 15 2004. ISSN 0002-9262 (Print)

0002-9262 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15466501> >.

MIYAKI, M.; KUROKI, T. Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 306, n. 4, p. 799-804, Jul 11 2003. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12821112> >.

MIYAZAWA, K. et al. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. **Genes Cells**, v. 7, n. 12, p. 1191-204, Dec 2002. ISSN 1356-9597 (Print)

1356-9597 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12485160> >.

MIYAZONO, K.; KUSANAGI, K.; INOUE, H. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. **J Cell Physiol**, v. 187, n. 3, p. 265-76, Jun 2001. ISSN 0021-9541 (Print)

0021-9541 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11319750> >.

MOTE, P. A. et al. Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 84, n. 8, p. 2963-71, Aug 1999. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10443705> >.

MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C. H. The regulation of TGFbeta signal transduction. **Development**, v. 136, n. 22, p. 3699-714, Nov 2009. ISSN 1477-9129 (Electronic)

0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19855013> >.

MOUSTAKAS, A.; SOUCHELNYTSKYI, S.; HELDIN, C. H. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. **J Cell Sci**, v. 114, n. Pt 24, p. 4359-69, Dec 2001. ISSN 0021-9533 (Print)

0021-9533 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792802> >.

NAP, A. W. et al. Pathogenesis of endometriosis. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 18, n. 2, p. 233-44, Apr 2004. ISSN 1521-6934 (Print)

1521-6934 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15157640> >.

NONAKA, S. et al. Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. **Nature**, v. 418, n. 6893, p. 96-9, Jul 4 2002. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12097914> >.

OLIVEIRA, F. R. et al. Stem cells: are they the answer to the puzzling etiology of endometriosis? **Histol Histopathol**, v. 27, n. 1, p. 23-9, Jan 2012. ISSN 1699-5848 (Electronic)

0213-3911 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22127593> >.

OMWANDHO, C. O. et al. Role of TGF-betas in normal human endometrium and endometriosis. **Hum Reprod**, v. 25, n. 1, p. 101-9, Jan 2010. ISSN 1460-2350 (Electronic)

0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19892717> >.

OSTEEN, K. G. et al. Progesterone-mediated endometrial maturation limits matrix metalloproteinase (MMP) expression in an inflammatory-like environment: a regulatory system altered in endometriosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 955, p. 37-47; discussion 86-8, 396-406, Mar 2002. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11949963> >.

PANGAS, S. A. Regulation of the ovarian reserve by members of the transforming growth factor beta family. **Mol Reprod Dev**, v. 79, n. 10, p. 666-79, Oct 2012. ISSN 1098-2795 (Electronic)

1040-452X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847922> >.

PAPAGEORGIOU, I. et al. Expression of nodal signalling components in cycling human endometrium and in endometrial cancer. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 7, p. 122, 2009. ISSN 1477-7827 (Electronic)

1477-7827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19874624> >.

PARK, C. B.; DUFORT, D. Elsevier Trophoblast Research Award lecture: The multifaceted role of Nodal signaling during mammalian reproduction. **Placenta**, v. 32 Suppl 2, p. S125-9, Mar 2011. ISSN 1532-3102 (Electronic)

0143-4004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21195476> >.

\_\_\_\_\_. NODAL signaling components regulate essential events in the establishment of pregnancy. **Reproduction**, v. 145, n. 2, p. R55-64, Feb 1 2013. ISSN 1741-7899 (Electronic)

1470-1626 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23221013> >.

PETRAGLIA, F. et al. Human decidua and in vitro decidualized endometrial stromal cells at term contain immunoreactive corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF messenger ribonucleic acid. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 74, n. 6, p. 1427-31, Jun 1992. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1375601> >.

PHILLIPS, D. J.; WOODRUFF, T. K. Inhibin: actions and signalling. **Growth Factors**, v. 22, n. 1, p. 13-8, Mar 2004. ISSN 0897-7194 (Print)

0897-7194 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15176454> >.

PICCOLO, S. et al. The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. **Nature**, v. 397, n. 6721, p. 707-10, Feb 25 1999. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10067895> >.

PIERCE, G. F. et al. Transforming growth factor beta reverses the glucocorticoid-induced wound-healing deficit in rats: possible regulation in macrophages by platelet-derived growth factor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 7, p. 2229-33, Apr 1989. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2928327> >.

POPOVICI, R. M.; KAO, L. C.; GIUDICE, L. C. Discovery of new inducible genes in in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. **Endocrinology**, v. 141, n. 9, p. 3510-3, Sep 2000. ISSN 0013-7227 (Print)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10965925> >.

POSTOVIT, L. M. et al. Targeting Nodal in malignant melanoma cells. **Expert Opin Ther Targets**, v. 11, n. 4, p. 497-505, Apr 2007. ISSN 1744-7631 (Electronic)

1472-8222 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17373879> >.

PRACTICE COMMITTEE OF AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE, M. Treatment of pelvic pain associated with endometriosis. **Fertil Steril**, v. 90, n. 5 Suppl, p. S260-9, Nov 2008. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19007642> >.

PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE, M. Endometriosis and infertility. **Fertil Steril**, v. 81, n. 5, p. 1441-6, May 2004. ISSN 0015-0282 (Print)

0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15136136> >.

\_\_\_\_\_. Endometriosis and infertility: a committee opinion. **Fertil Steril**, v. 98, n. 3, p. 591-8, Sep 2012. ISSN 1556-5653 (Electronic)  
0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22704630> >.

QUAIL, D. F. et al. Nodal signalling in embryogenesis and tumourigenesis. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 45, n. 4, p. 885-98, Apr 2013. ISSN 1878-5875 (Electronic)  
1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23291354> >.

RAMATHAL, C. Y. et al. Endometrial decidualization: of mice and men. **Semin Reprod Med**, v. 28, n. 1, p. 17-26, Jan 2010. ISSN 1526-4564 (Electronic)  
1526-4564 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20104425> >.

RANGEL, M. C. et al. Role of Cripto-1 during epithelial-to-mesenchymal transition in development and cancer. **Am J Pathol**, v. 180, n. 6, p. 2188-200, Jun 2012. ISSN 1525-2191 (Electronic)  
0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22542493> >.

REMORGIDA, V. et al. Bowel endometriosis: presentation, diagnosis, and treatment. **Obstet Gynecol Surv**, v. 62, n. 7, p. 461-70, Jul 2007. ISSN 0029-7828 (Print)  
0029-7828 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17572918> >.

ROCHA, A. L. et al. Altered expression of activin, cripto, and follistatin in the endometrium of women with endometrioma. **Fertil Steril**, v. 95, n. 7, p. 2241-6, Jun 2011. ISSN 1556-5653 (Electronic)  
0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21496809> >.

ROGERS, P. A. et al. Endometrial angiogenesis, vascular maturation, and lymphangiogenesis. **Reprod Sci**, v. 16, n. 2, p. 147-51, Feb 2009. ISSN 1933-7205 (Electronic)  
1933-7191 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19001552> >.

ROSA, F. M. Cripto, a multifunctional partner in signaling: molecular forms and activities. **Sci STKE**, v. 2002, n. 158, p. pe47, Nov 12 2002. ISSN 1525-8882 (Electronic)  
1525-8882 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429886> >.

SAMPSON, J. A. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. **Am J Pathol**, v. 3, n. 2, p. 93-110 43, Mar 1927. ISSN 0002-9440 (Print)  
0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19969738> >.

SASSON, I. E.; TAYLOR, H. S. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1127, p. 106-15, Apr 2008. ISSN 0077-8923 (Print)  
0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18443337> >.

SCHIER, A. F. Nodal morphogens. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 1, n. 5, p. a003459, Nov 2009. ISSN 1943-0264 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20066122> >.

SCHIER, A. F.; SHEN, M. M. Nodal signalling in vertebrate development. **Nature**, v. 403, n. 6768, p. 385-9, Jan 27 2000. ISSN 0028-0836 (Print)  
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10667782> >.

SHEN, M. M. Decrypting the role of Cripto in tumorigenesis. **J Clin Invest**, v. 112, n. 4, p. 500-2, Aug 2003. ISSN 0021-9738 (Print)  
0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12925690> >.

\_\_\_\_\_. Nodal signaling: developmental roles and regulation. **Development**, v. 134, n. 6, p. 1023-34, Mar 2007. ISSN 0950-1991 (Print)  
0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17287255> >.

SHI, Y.; MASSAGUE, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 685-700, Jun 13 2003. ISSN 0092-8674 (Print)  
0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12809600> >.

SILBIGER, S. et al. Estradiol reverses TGF-beta1-stimulated type IV collagen gene transcription in murine mesangial cells. **Am J Physiol**, v. 274, n. 6 Pt 2, p. F1113-8, Jun 1998. ISSN 0002-9513 (Print)  
0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9841504> >.

SINGH, M.; CHAUDHRY, P.; ASSELIN, E. Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. **J Endocrinol**, v. 210, n. 1, p. 5-14, Jul 2011. ISSN 1479-6805 (Electronic)  
0022-0795 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21372150> >.

STOIKOS, C. J. et al. A distinct cohort of the TGFbeta superfamily members expressed in human endometrium regulate decidualization. **Hum Reprod**, v. 23, n. 6, p. 1447-56, Jun 2008. ISSN 1460-2350 (Electronic)  
0268-1161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18434375> >.

STRIZZI, L. et al. Nodal expression and detection in cancer: experience and challenges. **Cancer Res**, v. 72, n. 8, p. 1915-20, Apr 15 2012. ISSN 1538-7445 (Electronic)  
0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22508696> >.

STRIZZI, L. et al. Potential for the embryonic morphogen Nodal as a prognostic and predictive biomarker in breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 14, n. 3, p. R75, 2012. ISSN 1465-542X (Electronic)  
1465-5411 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22577960> >.

STRIZZI, L. et al. Nodal as a biomarker for melanoma progression and a new therapeutic target for clinical intervention. **Expert Rev Dermatol**, v. 4, n. 1, p. 67-78, 2009. ISSN 1746-9872 (Print)  
1746-9872 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19885369> >.

TANG, B.; GULLER, S.; GURPIDE, E. Mechanism of human endometrial stromal cells decidualization. **Ann N Y Acad Sci**, v. 734, p. 19-25, Sep 30 1994. ISSN 0077-8923 (Print)  
0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7978916> >.

TEN DIJKE, P.; HILL, C. S. New insights into TGF-beta-Smad signalling. **Trends Biochem Sci**, v. 29, n. 5, p. 265-73, May 2004. ISSN 0968-0004 (Print)  
0968-0004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15130563> >.

TORRES, P. B. et al. Activin A, activin receptor type II, nodal, and cripto mRNA are expressed by eutopic and ectopic endometrium in women with ovarian endometriosis. **Reprod Sci**, v. 16, n. 8, p. 727-33, Aug 2009. ISSN 1933-7205 (Electronic) 1933-7191 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19386982> >.

TSAI, M. J.; O'MALLEY, B. W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. **Annu Rev Biochem**, v. 63, p. 451-86, 1994. ISSN 0066-4154 (Print) 0066-4154 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7979245> >.

TSUCHIDA, K. et al. Signal transduction pathway through activin receptors as a therapeutic target of musculoskeletal diseases and cancer. **Endocr J**, v. 55, n. 1, p. 11-21, Mar 2008. ISSN 1348-4540 (Electronic) 0918-8959 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17878607> >.

VALDIMARSDOTTIR, G. et al. Smad7 and protein phosphatase 1alpha are critical determinants in the duration of TGF-beta/ALK1 signaling in endothelial cells. **BMC Cell Biol**, v. 7, p. 16, 2006. ISSN 1471-2121 (Electronic) 1471-2121 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16571110> >.

VALLE, R. F.; SCIARRA, J. J. Endometriosis: treatment strategies. **Ann N Y Acad Sci**, v. 997, p. 229-39, Nov 2003. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644830> >.

VALLIER, L. et al. Early cell fate decisions of human embryonic stem cells and mouse epiblast stem cells are controlled by the same signalling pathways. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e6082, 2009. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19564924> >.

VERCELLINI, P.; CORTESI, I.; CROSIGNANI, P. G. Progestins for symptomatic endometriosis: a critical analysis of the evidence. **Fertil Steril**, v. 68, n. 3, p. 393-401, Sep 1997. ISSN 0015-0282 (Print) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9314903> >.

WAGNER, D. O. et al. BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. **Sci Signal**, v. 3, n. 107, p. mr1, 2010. ISSN 1937-9145 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20124549> >.

WAKEFIELD, L. M.; HILL, C. S. Beyond TGFbeta: roles of other TGFbeta superfamily members in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 5, p. 328-41, May 2013. ISSN 1474-1768 (Electronic) 1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23612460> >.

WAKEFIELD, L. M.; ROBERTS, A. B. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. **Curr Opin Genet Dev**, v. 12, n. 1, p. 22-9, Feb 2002. ISSN 0959-437X (Print) 0959-437X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11790550> >.

WANG, H. et al. Role and regulation of nodal/activin receptor-like kinase 7 signaling pathway in the control of ovarian follicular atresia. **Mol Endocrinol**, v. 20, n. 10, p. 2469-82, Oct 2006. ISSN 0888-8809 (Print) 0888-8809 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16709598> >.



WRANA, J. L. Crossing Smads. **Sci STKE**, v. 2000, n. 23, p. re1, Mar 14 2000. ISSN 1525-8882 (Electronic) 1525-8882 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752591> >.

WRANA, J. L.; ATTISANO, L. The Smad pathway. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 11, n. 1-2, p. 5-13, Mar-Jun 2000. ISSN 1359-6101 (Print) 1359-6101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10708948> >.

WU, L. et al. Smad4 as a transcription corepressor for estrogen receptor alpha. **J Biol Chem**, v. 278, n. 17, p. 15192-200, Apr 25 2003. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12576474> >.

YAN, X.; LIU, Z.; CHEN, Y. Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 41, n. 4, p. 263-72, Apr 2009. ISSN 1745-7270 (Electronic) 1672-9145 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19352540> >.

YANG, N. N. et al. Identification of an estrogen response element activated by metabolites of 17beta-estradiol and raloxifene. **Science**, v. 273, n. 5279, p. 1222-5, Aug 30 1996. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8703055> >.

YEO, C.; WHITMAN, M. Nodal signals to Smads through Cripto-dependent and Cripto-independent mechanisms. **Mol Cell**, v. 7, n. 5, p. 949-57, May 2001. ISSN 1097-2765 (Print) 1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11389842> >.

ZEITOUN, K. M.; BULUN, S. E. Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target. **Fertil Steril**, v. 72, n. 6, p. 961-9, Dec 1999. ISSN 0015-0282 (Print) 0015-0282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10593363> >.

ZHAO, Y. et al. The coregulator, repressor of estrogen receptor activity (REA), is a crucial regulator of the timing and magnitude of uterine decidualization. **Endocrinology**, v. 154, n. 3, p. 1349-60, Mar 2013. ISSN 1945-7170 (Electronic) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23392257> >.

ZHU, J. et al. Inhibin alpha-subunit N terminus interacts with activin type IB receptor to disrupt activin signaling. **J Biol Chem**, v. 287, n. 11, p. 8060-70, Mar 9 2012. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22267736> >.

ZIMMERMAN, C. M.; PADGETT, R. W. Transforming growth factor beta signaling mediators and modulators. **Gene**, v. 249, n. 1-2, p. 17-30, May 16 2000. ISSN 0378-1119 (Print) 0378-1119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10831835> >.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

**Projeto: CAAE – 0199.0.203.000-11**

**Interessado(a): Prof. Fernando Marcos dos Reis  
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia  
Faculdade de Medicina - UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 08 de agosto de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo da via de sinalização do nodal na fisiopatologia da endometriose**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG**

## **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

### *Estudo da via de sinalização do nodal na fisiopatologia da endometriose*

Prezada Senhora,

Gostaria de convidá-la a participar de um estudo científico que tem a finalidade de gerar novos conhecimentos sobre a endometriose.

#### **I. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA**

Esta pesquisa visa ao estudo de moléculas relacionadas com a endometriose, na tentativa de se descobrir possíveis causas e novos tratamentos para a doença. Você está sendo convidada porque sua avaliação médica já previa a realização de histeroscopia ou laparoscopia, independentemente da pesquisa. Nesta pesquisa será utilizada somente uma pequena amostra do tecido endometrial. A amostra será coletada no momento em que você estiver anestesiada, no bloco cirúrgico, imediatamente antes do início da laparoscopia, ou na sala de histeroscopia diagnóstica ambulatorial, logo após a realização da histeroscopia diagnóstica.

#### **II. SIGILO DOS DADOS**

Todos os seus dados serão confidenciais, sua identidade não será revelada publicamente em hipótese alguma e somente os pesquisadores envolvidos neste projeto terão acesso a essas informações, que serão utilizadas somente para fins de pesquisa.

#### **III. BENEFÍCIOS DA PESQUISA**

Embora não traga benefício imediato para você, este estudo irá contribuir para o conhecimento mais detalhado da endometriose. Esse conhecimento poderá ajudar no desenvolvimento de novos métodos para diagnosticar e tratar a doença.

#### **IV. RISCOS**

A coleta de amostra do endométrio pode causar desconforto e cólica momentânea. A amostra será colhida em material inteiramente estéril e descartável, que não oferece risco para a sua saúde.

#### **V. RESSARCIMENTO DAS DESPESAS**

Não está prevista qualquer forma de remuneração para as voluntárias, nem ressarcimento de despesas. Entretanto, as despesas específicas relacionadas com o estudo são de responsabilidade dos pesquisadores.

#### **VI. DEMAIS ESCLARECIMENTOS**

Você dispõe de total liberdade para esclarecer qualquer dúvida que possa surgir durante a pesquisa. Você poderá recusar-se a participar deste estudo e/ou abandoná-lo a qualquer momento, sem precisar se justificar. A aceitação ou não da participação neste estudo não influenciará no seu tratamento.

#### **VII. TERMO DE CONSENTIMENTO**

Eu, \_\_\_\_\_ voluntariamente, concordo em participar desta pesquisa no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Estou ciente do exposto acima e ainda de que esta pesquisa não trará qualquer prejuízo à minha saúde.

Belo Horizonte,.....de.....de.....

---

Assinatura da voluntária

---

Cynthia Dela Cruz de Freitas (pesquisadora)  
Telefone: 3409-9264

---

Fernando Marcos dos Reis (pesquisador principal)  
Telefone: 3409-9264

Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo, contatar os pesquisadores no Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da UFMG: Av. Prof. Alfredo Balena, nº 110, 9º andar, ala norte, Santa Efigênia, Belo Horizonte – MG. Fone: 3409-9484. Comitê de Ética em Pesquisa (COEP): Av. Antonio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II, 2º Andar, sala 2005 - Pampulha, Belo Horizonte – MG. Fone: (31) 3409-4592