

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher

LARISSA MILANI COUTINHO

**EFEITOS DA ATIVINA A E DA FOLISTATINA SOBRE A APOPTOSE
DE CÉLULAS ESTROMAIS DO ENDOMÉTRIO HUMANO**

Belo Horizonte
2015

LARISSA MILANI COUTINHO

**EFEITOS DA ATIVINA A E DA FOLISTATINA SOBRE A APOPTOSE
DE CÉLULAS ESTROMAIS DO ENDOMÉTRIO HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde da Mulher.

Área de Concentração: Reprodução Humana e Patologia Ginecológica

Orientador: Prof. Fernando Marcos dos Reis

Coorientadora: Prof.^a Helen Lima Del Puerto

**Belo Horizonte
2015**

À minha família, por ser a base de tudo o que sou.

Ao meu amado esposo Eduardo.

À minha pequena Lara, luz dos meus olhos.

Aos meus queridos pais, Marlene e Tadeu.

Aos meus queridos irmãos Conrado e Diego

e meus adorados sobrinhos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Fernando Marcos dos Reis, primeiramente por ter aberto as portas e me aceitado como sua aluna e, principalmente, pela terna acolhida e amizade. Terás sempre minha gratidão e admiração.

À minha coorientadora Profa. Helen Lima Del Puerto, pelas orientações e ajuda na realização dos experimentos.

À Cynthia Dela Cruz, por ter sido um verdadeiro anjo da guarda ao longo de todo o mestrado. Muito obrigada pela grande disponibilidade e principalmente pela amizade.

Ao Dr. João Vaz, à Maira Casalechi e Verônica Lobach, pelo carinho e valiosa ajuda no laboratório.

À Dra. Ines Katerina Damasceno, Dr. Francisco de Assis e demais médicos preceptores do Laboratório de Reprodução Humana Professor Aroldo F. Camargos (LRH HC-UFMG), pelo auxílio durante a coleta das biópsias e pelos inúmeros e preciosos ensinamentos.

Ao Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica da Faculdade de Medicina-UFMG, pela realização da citometria de fluxo. Obrigada ao Prof. Antônio Teixeira pela parceria e, em especial, à Érica Vieira pela grande disponibilidade e por ter sido tão atenciosa e paciente.

À toda equipe do LRH HC-UFMG, pela amizade e por terem dado mais leveza aos meus dias longe da família.

Às pacientes, pelo altruísmo e importante colaboração.

Ao Professor Aroldo Camargos, por ter me dado tantas oportunidades, todo o meu carinho e gratidão.

Ao meu amado esposo Eduardo, por ter enxugado minhas lágrimas e me dado a força que tantas vezes precisei para aguentar a distância. Obrigada pelo

grande amor e pela generosidade em me deixar alçar voos cada vez mais altos.

À minha adorada filha Lara, obrigada pelos teus sorrisos e pelo teu olhar profundo que me tocam o coração e me fazem querer ser uma pessoa cada vez melhor.

Ao meu querido pai Tadeu, por ser meu mestre e meu maior incentivador. Sem o seu exemplo e apoio incondicional, talvez este sonho não se tornasse possível.

À minha querida mãe Marlene, por ser minha referência de mulher, forte e ao mesmo tempo terna, e por estar tão presente nesta etapa final do mestrado, me ajudando nos cuidados com a minha pequenina.

Aos meus irmãos Conrado e Diego, merecedores da minha admiração, pela grande torcida, e aos meus estimados sobrinhos e afilhados por trazerem alegria aos meus dias.

Obrigada a Deus, por se fazer presente em minha vida, guiando e protegendo meus caminhos.

“Nada neste mundo faz sentido
se não tocarmos o coração das pessoas.
Se a gente cresce com os golpes duros da vida,
também podemos crescer com os toques suaves da alma.”

Cora Coralina

UF *m* G



inct
institutos nacionais
de ciência e tecnologia



Trabalho realizado no Laboratório de Reprodução Humana Prof. Aroldo F. Camargos, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (Processo 573747/2008-3) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais- FAPEMIG (Processo APQ-02032-12), por meio do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Hormônios e Saúde da Mulher.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ActRIB- Receptor de ativina Tipo I B

ActRIIB- Receptor de ativina Tipo II B

ALK4- *Activin receptor-like kinase*

Apaf-1- Fator de ativação de proteases pró-apoptóticas

ATP- Adenosina trifosfato

Bcl-2- *B-cell lymphoma protein 2*

CARD- Domínio de recrutamento de caspase

cDNA- DNA complementar

CO₂- Dióxido de carbono

CSS- *Charcoal Stripped Serum*

CT- *Cycle threshold*

DD- Domínio de morte

DED- Domínio efetor de morte

DISC- Complexo sinalizador de indução de morte

DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMEM/F12- Meio composto de partes iguais dos meios DMEM e F12

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DNase- Desoxirribonuclease

ELISA- *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FADD- *Fas-associated death domain protein*

FS- Folistatina

FS-288- Folistatina, forma curta

FS-315- Folistatina, forma longa

FSH- Hormônio folículo estimulante

FITC- Isotiocianato de fluoresceína

HC- Hospital das Clínicas

HESC- Células estromais do endométrio humano

LRH- Laboratório de Reprodução Humana

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PI- Iodeto de propídio

RNA- Ácido ribonucleico

RNAm- RNA mensageiro

RNase- Ribonuclease

rpm- Rotações por minuto

RT- Transcrição reversa

S26- Subunidade da proteína ribossomal

SBF- Soro bovino fetal

SF 0,9%- Soro fisiológico 0,9%

TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido

TGF- β - Fator de crescimento e transformação beta

TNF- Fator de necrose tumoral

TNFR1- Receptor 1 do fator de necrose tumoral

TNFR2- Receptor 2 do fator de necrose tumoral

TRAAD- *TNF receptor associates death domain*

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

VHD- Vídeo-histeroscopia diagnóstica

VLP- Videolaparoscopia

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática da composição das ativinas e inibinas..... 02
- Figura 2:** Representação esquemática do mecanismo de sinalização das ativinas via Smads. 03
- Figura 3:** Representação esquemática dos mecanismos de ação das antagonistas da ativina: folistatina e inibina. 05
- Figura 4:** Corte histológico do endométrio..... 07
- Figura 5:** Representação esquemática das alterações endometriais, regidas pelos hormônios sexuais ovarianos, ao longo do ciclo menstrual. 07
- Figura 6:** Representação esquemática da via extrínseca da apoptose..... 19
- Figura 7:** Representação esquemática da via intrínseca da apoptose. 20
- Figura 8:** Esquema ilustrativo do protocolo de preparo do meio de crescimento para cultivo de células estromais do endométrio humano. 27
- Figura 9:** Esquema ilustrativo do protocolo para cultivo de células estromais do endométrio humano..... 27
- Figura 10:** Poço contendo células estromais do endométrio humano em confluência..... 28

GRÁFICOS

Gráfico 1: Estratégia de análise utilizada para avaliação da morte celular por expressão de anexina V e iodeto de propídio (PI) nas células do estroma endometrial submetidas a diferentes tratamentos. 31

Gráfico 2: Detecção da anexina V conjugada com FITC e iodeto de propídio em células estromais do endométrio humano cultivadas sem estímulo (A), tratadas unicamente com ativina A (B), e tratadas com ativina A + folistatina (C). 40

Gráfico 3: Frequência total das células mortas, incluindo apoptose (células positivas para qualquer dos marcadores: anexina V-FITC, PI ou ambos). 41

Gráfico 4: Proporção de HESC em apoptose inicial (positivo para anexina V-FITC apenas). 42

Gráfico 5: Avaliação do efeito da ativina A, e de seu antagonista folistatina, sobre as concentrações de TNF liberadas nos meios de cultura das HESC. 43

Gráfico 6: Comparação da distribuição da expressão dos genes reguladores da apoptose nas HESC sem estimulação (controle), com ativina A isoladamente e com ativina A e folistatina. 44

TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de PCR em tempo real.	35
--	----

SUMÁRIO

I- INTRODUÇÃO	01
1- Ativinas.....	01
2-Folistatina	04
3-Ativina A e endométrio.....	06
3.1- Características morfológicas e funcionais do endométrio humano.....	06
3.2- Ação da Ativina A no endométrio	09
4-Morte celular.....	11
4.1-Necrose <i>versus</i> apoptose	13
4.2-Mecanismos de regulação da apoptose.....	15
4.2.1-Família das caspases	15
4.2.2-Família Bcl-2.....	16
4.2.3-Fator de Necrose Tumoral	17
4.2.4-Vias de sinalização da apoptose.....	17
4.2.4.1-Via extrínseca	18
4.2.4.2-Via intrínseca	19
4.3-Detecção laboratorial da apoptose	20
4.4-Apoptose e endométrio.....	22
II-OBJETIVOS	24
1-Objetivo Geral.....	24
2- Objetivo Especifico	24
III- MATERIAIS E MÉTODOS	25
1-Pacientes e amostras celulares	25
2-Culturas celulares primárias	25
3-Detecção da apoptose por citometria de fluxo	29

3.1-Avaliação da morte celular por coloração com anexina V e iodeto de propídio	29
3.2-Estratégia de análise para a avaliação da morte celular por anexina V e iodeto de propídio	30
3.3- Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de TNF.....	32
3.4- Extração de RNA e reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.	32
3.4.1-Extração de RNA total	33
3.4.2-Síntese do DNA complementar pela transcrição reversa (RT).....	33
3.4.3-Seleção, desenho e síntese dos oligonucleotídeos iniciadores.....	34
3.4.4-PCR em tempo real	35
3.5-Análise estatística.....	37
IV- RESULTADOS	38
1-Detecção da apoptose por citometria de fluxo	38
2-Ensaio imunoenzimático, ELISA.....	42
3-PCR em tempo real	44
V-DISCUSSÃO	45
VI-CONCLUSÕES	51
VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

RESUMO

A ativina A é um fator de crescimento que estimula a decidualização, apresentando expressão relevante em desordens proliferativas do endométrio. A existência de uma ação direta da ativina A na sobrevivência de células endometriais, entretanto, ainda é desconhecida. O presente estudo investigou, em células estromais do endométrio humano (HESC), os efeitos da ativina A, e de seu antagonista folistatina, sobre: as taxas de morte celular total e apoptose; a liberação do fator de necrose tumoral (TNF); e a expressão dos genes relacionados à apoptose (Bcl-2, Bax, caspase-3 e caspase-8). Foi realizado um estudo *in vitro*, prospectivo e controlado, utilizando culturas primárias de HESC, obtidas de mulheres em idade reprodutiva (n=11). As células foram tratadas com meio de cultura apenas (controle), ou ativina A isoladamente (25 ng/ml) ou ativina A (25 ng/ml) e folistatina (250 ng/ml). A frequência de células efetivamente mortas e em processo de apoptose foi aferida por citometria de fluxo. As concentrações de TNF nos meios de cultura foram quantificadas por ELISA. A expressão dos genes reguladores da apoptose foi analisada por PCR em tempo real. A ativina A reduziu a porcentagem de células mortas/apoptóticas de 31% para 22% ($p < 0,05$, teste *t* pareado) e diminuiu os níveis de TNF nos meios de cultura em 14%, embora não tenha sido detectada uma correlação linear entre a liberação do TNF e as taxas de apoptose. Ambos os efeitos produzidos pela ativina A foram revertidos pela folistatina. Não houve diferença estatisticamente significativa da expressão dos genes reguladores da apoptose entre os grupos de tratamento. Esses resultados sugerem que a ativina A é capaz de promover a sobrevivência das HESC. Não obstante os mecanismos regulatórios envolvidos neste processo ainda não estejam claros, é provável que o efeito da ativina A deva estar relacionado a uma via independente do TNF. Os presentes achados suportam o papel crucial da ativina A sobre processos fisiológicos e patológicos relacionados ao crescimento e diferenciação das células estromais do endométrio humano.

Palavras-chaves: ativina A, apoptose, endométrio, folistatina.

ABSTRACT

Activin A is a growth factor that stimulates decidualization and is abundantly expressed in endometrial proliferative disorders. Nevertheless, whether it directly affects endometrial cell survival is still unknown. This study investigated the effects of activin A, and its antagonist follistatin, on total death and apoptosis rates and on tumor necrosis factor (TNF) release by human endometrial stromal cells (HESC). We also evaluated the effect of activin A, with and without follistatin, on expression of apoptosis-related genes (Bcl-2, Bax, caspase-3 and caspase-8) in HESC. We performed a controlled prospective in vitro study using primary HESC cultures obtained from healthy reproductive age women (n=11). Cells were treated with medium alone (control) or activin A (25 ng/mL) or activin A (25ng/mL) and follistatin (250ng/mL). Apoptosis and total cell death were measured by flow cytometry, while TNF concentrations in culture media were quantified by ELISA. The expression of apoptosis regulatory genes was assessed by real time PCR. Activin A decreased the percentage of apoptotic/dead cells from 31% to 22% (p<0.05, paired t test) and reduced TNF levels in culture medium by 14%, but there was no linear correlation between TNF release and apoptotic rates. Both effects of activin A were reversed by follistatin. The expression of apoptosis regulatory genes was not significantly different among the groups. These findings indicate that activin A promotes HESC survival, possibly by a TNF-independent pathway. This mechanism may be critical to the actions of activin A upon stromal cell growth and differentiation in physiology and disease.

Key-words: activin A, apoptosis, endometrium, follistatin.