

	<b>Pág.</b>
<b>ÍNDICE GERAL</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE UNIDADES DE MEDIDAS</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xii</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1. ENDOMETRIOSE</b>	
1.1- Conceito, clínica, epidemiologia, etiopatogenia	<b>2</b>
1.2- Diagnóstico	<b>6</b>
<b>2. ATIVINA A, PROTEÍNAS RELACIONADAS À ATIVINA A, FOLISTATINA, ENDOMÉTRIO E ENDOMETRIOSE</b>	<b>10</b>
2.1 Estrutura e síntese das ativinas e inibinas	<b>10</b>
2.2 Mecanismos de sinalização da ativina e antagonismo da inibina	<b>11</b>
2.3 Folistatina	<b>13</b>
2.4 Ativina A, proteínas relacionadas à ativina A, folistatina, endométrio e endometriose	<b>14</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>19</b>
1- PACIENTES E MÉTODOS	<b>20</b>
-Experimento 1- Expressão de ativina A, proteínas relacionadas à ativina A	<b>20</b>

e folistatina no endométrio e endometriose

-Experimento 2- Avaliação dos níveis séricos da ativina A e folistatina em portadoras de endometriose	24
-Experimento 3 – Efeitos da ativina A e da folistatina sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias e mediadores da angiogênese em culturas de células derivadas de endométrio de mulheres com e sem endometriose	27
<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>32</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
1- Experimento 1	34
1.1- Endométrio eutópico	34
1.1.1- Ativina A, ativina B e receptores da ativina	34
1.1.2- Moduladores do receptor da ativina: nodal e cripto	36
1.1.3- Antagonista e proteína ligadora: inibina $\alpha$ e folistatina	38
1.2- Tecido ectópico	39
2- Experimento 2	40
3- Experimento 3	44
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
- Experimento 1	50
- Experimento 2	54
- Experimento 3	56
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>65</b>

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Nº</b>		<b>Pág.</b>
<b>1</b>	Patogênese da endometriose	<b>6</b>
<b>2</b>	Mecanismo de sinalização da ativina	<b>13</b>
<b>3</b>	Expressão de (A) ativina A, (B) ativina B, e (C) ActRII mRNA no endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose e tecido endometriótico durante as fases proliferativa e secretora do ciclo	<b>35</b>
<b>4</b>	Expressão do mRNA de (A) nodal e (B) cripto no endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose e no tecido ectópico, durante as fases proliferativa e secretora ciclo menstrual.	<b>37</b>
<b>5</b>	Expressão do mRNA de (A) inibina $\alpha$ e (B) folistatina endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose e no tecido ectópico, durante as fases proliferativa e secretora ciclo menstrual.	<b>38-39</b>
<b>6</b>	Níveis séricos de ativina A, folistatina (FS) e o produto ativina A x FS em mulheres com endometriose peritoneal, endometrioma e endometriose profunda, comparadas com o grupo controles sem endometriose.	<b>42</b>
<b>7</b>	Variação percentual de IL-6 mRNA (A) e variação percentual da secreção (B) em HESCs de mulheres com e sem endometriose, tratadas com diferentes concentrações de ativina A e folistatina.	<b>46</b>
<b>8</b>	Variação percentual de IL-8 mRNA (A) e variação percentual da secreção (B) em HESCs de mulheres com e sem endometriose, tratadas com diferentes concentrações de ativina A e folistatina.	<b>47</b>

- 9** Variação percentual de VEGF mRNA (A) e variação percentual da secreção **48**  
(B) em HESCs de mulheres com e sem endometriose, tratadas com  
diferentes concentrações de ativina A e folistatina.

**ÍNDICE DE TABELAS**

<b>Nº</b>		<b>Pág.</b>
<b>1</b>	Características dos dois grupos, mulheres com e sem endometriose, nas diferentes fases do ciclo menstrual.	<b>21</b>
<b>2</b>	Conjunto de sondas de expressão gênica usada na Real Time-PCR (experimento 1).	<b>22</b>
<b>3</b>	Características das amostras para HESC.	<b>29</b>
<b>4</b>	Conjunto de ensaios enzimáticos usados para realização de ELISA.	<b>30</b>
<b>5</b>	Conjunto de sondas de expressão gênica usada na Real Time-PCR (experimento 3).	<b>31</b>
<b>6</b>	Sensibilidade e razão de verossimilhança positiva correspondentes a 90% de especificidade na detecção do endometrioma com níveis séricos de ativina A, folistatina, ou ambos.	<b>43</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ActRI (A ou B) – Receptor de Ativina Tipo I (A ou B)

ActRII (A ou B) - Receptor de Ativina Tipo II (A ou B)

ALK – do inglês, *activin receptor-like kinase*

BAMBI – do inglês, *BMP and activin Membrane-Bound Inhibitor*

BMP – do inglês, *Bone Morphogenetic Protein*

CA125 – do inglês, *Cancer Antigen 125*, marcador tumoral

cDNA – DNA complementar

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMEM / F12 – Meio compost de partes iguais dos meios DMEM e F-12

DMSO – Dimetil Sulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DNase – Desoxirribonuclease

FLRG – do inglês, *Follistatin Related Gene*

FS-288 – folistatina, forma curta

FS-303 – folistatina, forma intermediária

FS-315 – folistatina, forma longa

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

HEPES – ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfônico

HESC- do inglês, *human endometrial stromal cells*

IL – interleucina

MMPs- do inglês, *matrix metalloproteinases*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RNA – Ácido ribonucléico

mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro

TGF  $\beta$  – Fator de crescimento e transformação beta

TNF- fator de crescimento tumoral

VEGF- fator de crescimento do endotélio vascular

## LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

°C- Grau Celsius

cm- Centímetro

cm<sup>3</sup> -Centímetro cúbico

m<sup>2</sup>- Metros quadrados

µl- Microlitro

m- Molar

mL- Mililitro

mm- Milímetro

ng- Nanograma

% -Porcento

rpm- Rotações por minuto

Kg-quilograma



## RESUMO

**Objetivos:** (1) Avaliar a expressão de folistatina, da subunidade beta-A da ativina/inibina (ativina A) e das proteínas relacionadas à ativina A, durante as fases do ciclo menstrual, no endométrio eutópico de pacientes com e sem endometriose e em lesões endometrióticas; (2) Verificar se as concentrações séricas de ativina A e folistatina diferem entre as várias formas de endometriose e se essas proteínas podem ser utilizadas como marcadores de endometriose; (3) Investigar os efeitos da ativina A e da folistatina sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias e mediadores de angiogênese em cultura *in vitro* de células derivadas de endométrio de mulheres com e sem endometriose.

**Material e métodos:** Estudo prospectivo desenvolvido nos Hospital das Clínicas da UFMG e na Università di Siena. *Pacientes:* Mulheres com e sem endometriose. Culturas de células estromais de endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose. *Métodos:* (1) Quantificação da expressão da ativina A, ativina B, receptor da ativina, nodal, cripto, inibina  $\alpha$ , e folistatina através da reação em cadeia da polimerase (Real Time-PCR) (96 pacientes); (2) Dosagens de ativina A e folistatina no sangue periférico de mulheres com e sem endometriose através de Kits ELISA (214 pacientes); (3) quantificação da expressão de IL-6, IL-8, VEGF por Real Time-PCR nas células das culturas e dosagens de IL-6, IL-8 e VEGF no meio de cultura de pacientes com e sem endometriose (12 culturas).

**Resultados:** O endométrio eutópico de pacientes com endometriose mostrou (1) expressão maior de ativina A RNAm na fase proliferativa e o não aumento

de sua expressão na fase secretora , (2) falha na variação da expressão endometrial do cripto e da inibina relacionadas com o ciclo menstrual, (3) padrão de expressão de folistatina RNAm inverso ao do grupo controle, (4) Endometriomas apresentaram variações semelhantes ao endométrio eutópico na expressão de ativina A e proteínas relacionadas à ativina A durante o ciclo menstrual. Com relação às dosagens séricas, o grupo do endometrioma apresentou níveis séricos de ativina A significativamente mais elevados do que os controles ( $0,22 \pm 0,01$  ng / ml vs  $0,17 \pm 0,01$  ng / ml,  $p < 0,01$ ). Nenhum subgrupo de endometriose apresentou níveis séricos de folistatina com diferenças significativas em comparação aos controles, enquanto os níveis encontrados no grupo com endometrioma ( $2,34 \pm 0,32$  ng / ml) foram maiores do que no grupo com endometriose profunda ( $1,50 \pm 0,17$  ng / ml,  $p < 0,05$ ). A área sob a curva ROC de ativina A foi 0,700 (intervalo de confiança 95% 0,605-0,794), enquanto que da folistatina foi 0,620 (0,510-0,730) para o diagnóstico de endometrioma de ovário. A combinação de ambos os marcadores em um índice de marcador duplo não melhorou significativamente a precisão diagnóstica. No estudo com culturas celulares, a secreção basal de IL-6 e IL-8 foram maiores no grupo com endometriose. Ativina A aumentou a secreção de IL-8 e VEGF em culturas de mulheres sem endometriose, mas diminuiu a secreção de IL-6 e IL-8 em células de mulheres com endometriose. Estes resultados foram cancelados pela folistatina.

**Conclusões:** o padrão alterado de expressão endometrial da ativina A, cripto (antagonista do receptor da ativina), e folistatina (proteína ligadora da ativina) sugere uma disfunção ativina e proteínas relacionadas na endometriose. Endometriomas mostraram alterações semelhantes da ativina e proteínas

relacionadas durante o ciclo menstrual, o que suporta biologia comum para endométrio eutópico e ectópico na endometriose. O presente estudo demonstrou que os níveis séricos de ativina A e folistatina não mudam significativamente na endometriose peritoneal ou profunda infiltrativa e têm acurácia diagnóstica limitada no diagnóstico de endometrioma. Este estudo mostrou, pela primeira vez, que a ativina A regula a expressão e secreção de citocinas e VEGF de maneira diferente em culturas de células de mulheres sem e com endometriose, sugerindo vários possíveis sítios de ação da ativina na patogênese da endometriose.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the expression pattern of activin A, activin receptors, and activin modulators messenger RNA (mRNA) in the eutopic endometrium of patients with endometriosis at different phases of the menstrual cycle and to evaluate the mRNA expression of the same proteins in endometriomas during the menstrual cycle. Activin A is a growth factor produced by the endometrium, whose actions are modulated by the binding protein follistatin. Both proteins are detectable in peripheral serum, raising the potential for novel serum markers of endometriosis. The study aimed to evaluate the effect of activin A and follistatin on interleukin (IL)-6, IL-8 and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from cultured human endometrial stromal cells from women with and without endometriosis.

**Material and Methods:** *Design:* Prospective study. *Setting:* University hospital. *Patient(s):* Women with and without endometriosis and Human endometrial stromal cells (HESC) treated with activin A at different doses with/without follistatin. *Methods:* Quantification of activin A, activin B, activin receptor II, nodal, cripto, inhibin a, and follistatin expression by real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Multicenter controlled study evaluating simultaneously serum activin A and follistatin concentrations in women with and without endometriosis. Quantification of IL-6, IL-8 and VEGF by real time polymerase chain reaction and measurement of these cytokines and VEGF secretion by ELISA.

**Results:** The eutopic endometrium of patients with endometriosis showed (1) higher activin A mRNA expression in the proliferative phase and a lack of late

secretory phase peak, (2) a lack of endometrial cycle-related variations of cripto and inhibin a mRNA expression, and (3) an inverse expression pattern of follistatin mRNA. Endometriomas showed similar variations in the expression of activin-related protein mRNA during the menstrual cycle as eutopic endometrium. The ovarian endometrioma group had serum activin A levels significantly higher than healthy controls ( $0.22 \pm 0.01$  ng/ml vs.  $0.17 \pm 0.01$  ng/ml,  $p < 0.01$ ). None of the endometriosis groups had serum follistatin levels significantly altered compared to healthy controls, while levels found in the endometrioma group ( $2.34 \pm 0.32$  ng/ml) were higher than in the deep endometriosis group (and  $1.50 \pm 0.17$  ng/ml,  $p < 0.05$ ). The area under the ROC curve of activin A was 0.700 (95% confidence interval 0.605-0.794), while that of follistatin was 0.620 (0.510-0.730) for the diagnosis of ovarian endometrioma. The combination of both markers into a duo marker index did not improve significantly their diagnostic accuracy. At baseline, IL-6, IL-8 and PGE2 secretion were higher in endometriosis group. Activin A increased IL-8 and VEGF secretion in HESc from controls but decreased IL-6 and IL-8 secretion in HESC from women with endometriosis. These results were abrogated by follistatin.

**Conclusions:** The disturbed expression of endometrial activin A, cripto (activin receptor antagonist), and follistatin (activin-binding protein) suggests a dysfunction of the activin pathway in endometriosis. Endometriomas showed similar changes of activin-related proteins during the menstrual cycle, which supports a common biology for eutopic and ectopic endometrium in endometriosis. The present study demonstrated that serum activin A and follistatin do not change significantly in peritoneal or deep infiltrating

endometriosis and have limited diagnostic accuracy in the diagnosis of ovarian endometrioma. The present study showed for the first time that activin A regulates the expression and secretion of cytokines and VEGF in a different way in cultured endometrial stromal cells from controls and patients with endometriosis, supporting several possible sites of activin action in the pathogenesis of endometriosis.

