

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

**PESQUISA DE MARCADORES
DE INDIFERENCIAÇÃO CELULAR EM
ENDOMÉTRIO EUTÓPICO E ECTÓPICO
DE MULHERES COM E SEM
ENDOMETRIOSE**

Flávia Ribeiro de Oliveira

Belo Horizonte – MG
2010

FLÁVIA RIBEIRO DE OLIVEIRA

**PESQUISA DE MARCADORES
DE INDIFERENCIAÇÃO CELULAR EM
ENDOMÉTRIO EUTÓPICO E ECTÓPICO
DE MULHERES COM E SEM
ENDOMETRIOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Medicina.

Área de concentração: Patologia Ginecológica e Reprodução.

Orientador: Aroldo Fernando Camargos.

Coorientador: Fernando Marcos dos Reis.

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina da UFMG

2010

DEDICATÓRIAS

Ao meu orientador, Prof. Aroldo Fernando Camargos,
professor e médico dedicado aos ensinamentos,
sempre zelando pelos preceitos de ética e humanidade.

Pessoa batalhadora, persistente e vitoriosa,
que merece muito mais que minha admiração e respeito...
Merece carinho e aplausos de toda a comunidade científica,
pela garra e exemplo de vida.

Ao meu coorientador, Prof. Fernando Marcos dos Reis,
pela sua capacidade única de manter a calma
mesmo diante dos problemas mais complexos.

À minha mãe e ao meu pai,
que foram os responsáveis pela minha formação
e que mesmo de longe sempre foram
minha fonte de força e inspiração...

Ao meu marido, Stanys,
meu grande amor, pelo incentivo, companheirismo
e presença sempre marcante.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre iluminou meus passos para seguir em frente com coragem, força, perseverança, **persistência** e fé, enfrentando obstáculos que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu orientador, Prof. Aroldo Fernando Camargos, por mais esta oportunidade. E ao meu coorientador, Prof. Fernando Marcos dos Reis, que foi também um grande orientador, pela competência e dedicação. Professor admirável por seu alto nível de qualificação científica e extremamente dedicado à docência.

A toda a equipe de pesquisa do Prof. Fernando Marcos dos Reis, em especial à Helen Del Puerto, pela ajuda e dedicação... E à amiga Cynthia Dela Cruz, pelo incansável apoio e carinho, sem os quais a finalização deste projeto não seria viável.

À minha professora de inglês, Marisa Mendonça, pelo auxílio contínuo.

À Professora Magda Barbosa Roquette Taranto, por sua disponibilidade e cuidado na correção gramatical deste trabalho.

Aos amigos da Maternidade Pública de Betim e da Maternidade do Hospital Risoleta Tolentino Neves, pela amizade e paciência, em especial Gisele, Cidinha, Ana Paula e Maria Alice.

Aos funcionários do Serviço de Anatomia Patológica, que tanto me ajudaram, em especial a: Margaret, Lourdinha, Lau, Renato e Prof^a. Helenice Gobbi.

Ao Prof. Tetsuo Maruyama, por permitir a reprodução de seus esquemas nesta dissertação, cuja autorização encontra-se no ANEXO A.

À equipe do Prof. Maurício Abrão, especialmente à patologista Anna Carolina Silva, que tão prontamente forneceu sua colaboração.

À amiga e ex-preceptora, Livia Leni, pelo apoio desde os tempos mais antigos da Maternidade Odete Valadares.

À Maria das Graças Rocha de Santana Camargos, a Graça, pela disponibilidade e atenção.

À amiga Cláudia Navarro, por sempre acreditar no meu potencial e me ajudar a enxergar que “tudo” é possível.

À colega de mestrado, Quésia Villamil, pelo companheirismo, força e apoio nos momentos difíceis.

Aos amigos Camila, Rubens, Chico, Ines, Estefânea, Márcia, Carol, Edna e todos os membros do Laboratório de Reprodução Humana Prof. Aroldo Fernando Camargos, sem os quais a realização deste projeto não seria possível. Em especial à Ju, por ser sempre tão prestativa e carinhosa.

Às minhas amigas: Érica, Lud e Vivian, que sempre estiveram ao meu lado.

Ao meu irmão e companheiro, Bruno, por ser essa pessoa maravilhosa e pela nossa união mesmo diante de tantos percalços...

À Tia Neide e família, pelo apoio e admiração. À minha sogra, Lourdinha, pela ternura maternal e pelas orações... Às afilhadas, Juju e Gabriela. A Ana, Gildo e Carol, pela presença constante...

Às pacientes que aceitaram fazer parte do estudo, sem as quais nada do que fazemos teria sentido.

À Banca Examinadora, pela disponibilidade e pelas críticas, sugestões e comentários que, sem dúvida, muito contribuirão para que eu continue me empenhando na carreira acadêmica.

A todos que direta ou indiretamente confiaram em mim e que contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

A todos vocês, muito obrigada!

Trabalho realizado no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Hormônios e Saúde da Mulher, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

*“Não importa onde você parou...
em que momento da vida você cansou...
o que importa é que sempre é possível e necessário **“recomeçar”**.
Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo...
é renovar as esperanças na vida e, o mais importante...
acreditar em você de novo...”*

Carlos Drummond de Andrade.

RESUMO

A endometriose é uma doença benigna crônica caracterizada pela presença de tecido semelhante ao endométrio fora da cavidade uterina. Essa doença tem alto grau de morbidade associado à infertilidade e à dor pélvica crônica. É provável que a causa da endometriose seja poligênica e multifatorial, mas o exato mecanismo patogênico ainda não está totalmente claro. Nos últimos anos, células-tronco adultas foram identificadas em vários tecidos humanos, incluindo o endométrio. Essas células provavelmente estão envolvidas na habilidade regenerativa cíclica endometrial e também na patogênese de doenças proliferativas ginecológicas, tais como a endometriose. A identificação de células-tronco progenitoras (CTPs) nos tecidos é bastante complexa, mas a presença de tais células pode ser presumida através de vários ensaios tais como clonogenicidade, *label retaining cells*, células “side population” (SP), identificação de marcadores de indiferenciação e diferenciação celular. O presente estudo avaliou a expressão dos marcadores de indiferenciação Musashi-1, Oct-4 e c-kit no endométrio eutópico de pacientes com e sem endometriose e em lesões endometrióticas. As amostras foram avaliadas por imunohistoquímica (IHQ) pelo sistema de polímeros não biotinilados. A análise estatística empregou o teste qui-quadrado para as variáveis categóricas e o teste de Kruskal-Wallis para as escalas de imunorreatividade. Foram empregadas quatro amostras de endométrio saudável e seis exemplares de endométrio eutópico e ectópico de pacientes com endometriose. A proteína Musashi-1 apresentou padrão de imunocoloração citoplasmático e nuclear, o Oct-4 predominantemente nuclear e a proteína c-kit citoplasmática e transmembrana. Os três marcadores se expressaram em todos os compartimentos endometriais analisados (glandular, estromal e endotelial). Houve maior percentual de expressão de Musashi-1 no endotélio de pacientes com endometriose ($p < 0,05$). A Musashi-1 e a c-kit se apresentaram em algumas lâminas com padrão de imunomarcção por agrupamentos celulares que podem corresponder a nichos de células-tronco. Todos os marcadores apresentaram percentual e intensidade de marcação consideravelmente alto. A c-kit teve expressão estromal comparativamente maior que a glandular ($p < 0,05$), além de maior imunorreatividade no estroma de endométrio eutópico de paciente com endometriose ($p < 0,05$). Em suma, é possível que supostas CTPs endometriais tenham algum papel na fisiopatologia da endometriose, não apenas na origem dos implantes ectópicos em si como também no processo de neoangiogênese.

Palavras-chave: Antígenos de superfície. Células-tronco adultas. Endométrio. Endometriose. Fisiopatologia.

ABSTRACT

Endometriosis is a benign disease characterized by the presence of tissue resembling the endometrium outside uterine cavity. This disease has a high degree of morbidity associated with infertility and chronic pelvic pain. It is possible that the cause of endometriosis is polygenic and multifactorial, but the exact pathogenic mechanisms are still not entirely clear. In recent years, adult stem cells have been identified in several human tissues, including endometrium. These cells are probably involved in regenerative ability of endometrium cycle, and also in the pathogenesis of proliferative gynaecological diseases, such as endometriosis. The identification of stem cells in tissues is very complex, but these cells are supposed to be found through several assays such as clonogenicity, label retaining cells, "side population" cells, identification of undifferentiation markers and cellular differentiation. This study evaluated the expression of undifferentiation markers Musashi-1, Oct-4 e c-kit in eutopic endometrium of patients with and without endometriosis and endometriotic lesions. Samples were evaluated by immunohistochemistry through biotin-free polymer system. For statistical analysis, the chi square test was used for categorical variables and Kruskal-Wallis test was used for immunoreactivity scales. The material to be analysed comprised four samples of healthy endometrium and six samples of both ectopic and eutopic endometrium from patients with endometriosis. Musashi-1 presented a cytoplasmic and nuclear immunostaining pattern, while Oct-4 presented a predominantly nuclear pattern and c-kit a cytoplasmic and transmembranous pattern. The three markers were expressed in all endometrial compartments analysed (glandular, stromal and endothelial). A higher expression of Musashi-1 was noted in endothelium of patients with endometriosis ($p<0,05$). In some slides, Mushashi-1 and c-kit presented a cellular group pattern, which may correspond to stem cell niches. All markers showed a relatively high percentage and staining intensity. c-kit had a stromal expression comparatively higher than glandular expression, ($p<0,05$) and a higher immunoreactivity in stroma of eutopic endometrium of patients with endometriosis. In summary, it is possible that endometrial putative stem/progenitor cells have a role in pathogenesis of endometriosis, not only in the origin of ectopic implants but also in the process of neoangiogenesis.

Key-words: Antigens, Surface. Adult stem cells. Endometrium. Endometriosis. Physiopathology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

FIGURA 1 Hipótese das CTPs endometriais como um novo mecanismo fisiopatológico para a endometriose.....	21
FIGURA 2 Divisão e diferenciação de células-tronco/progenitoras adultas.....	22
FIGURA 3 Estrutura dos nichos de células-tronco/progenitoras.....	23
FIGURA 4 Atividades reguladas pela proteína c-kit.....	30
FIGURA 5 Mapa do receptor Notch-1 e sua interação com a proteína Musashi-1....	31
FIGURA 6 Esquema de IHQ pelo método ABC.....	35
FIGURA 7 Esquema do sistema de polímeros da IHQ em duas etapas.....	36
FIGURA 8 Sistema de coloração manual para desparafinização, desidratação e reidratação de lâminas e câmara úmida de IHQ.....	37
FIGURA 9 Microscopia óptica de tecido endometrial de paciente saudável com amplificação de 200 X, demonstrando o padrão celular de marcação dos anticorpos Musashi-1, Oct-4 e c-kit.....	41
FIGURA 10 Microscopia com aumento de 200 X para imunolocalização do marcador Musashi-1.....	44
FIGURA 11 Microscopia com aumento de 200 X para a imunolocalização do marcador Oct-4.....	47
FIGURA 12 Microscopia com aumento de 200 X para imunolocalização do marcador c-kit.....	50

Gráficos

GRÁFICO 1 Percentual de amostras que expressaram as proteínas Musashi-1, Oct-4 e c-kit nos compartimentos celulares (membrana / citoplasma / núcleo)	40
GRÁFICO 2 Percentual de amostras que expressaram as proteínas Musashi-1, Oct-4 e c-kit nos compartimentos tissulares endometriais (epitélio glandular, estroma e endotélio vascular).....	42
GRÁFICO 3 Comparação entre os IRS glandular e estromal da proteína Musashi-1 de todas as amostras analisadas.....	45
GRÁFICO 4 IRS da proteína Musashi-1 por grupos (controle, eutópico e lesão).....	46

GRÁFICO 5 Comparação entre os IRS glandular e estromal da proteína Oct-4 para o global de amostras.....	48
GRÁFICO 6 IRS do Oct-4 por grupos (controle, eutópico e lesão).....	49
GRÁFICO 7 Comparação entre os IRS glandular e estromal da proteína c-kit de todas as amostras analisadas.....	51
GRÁFICO 8 IRS da proteína c-kit por grupos (controle, eutópico e lesão).....	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Proporção de amostras que expressaram as proteínas Musashi-1, Oct-4 e c-kit nos compartimentos tissulares endometriais (epitélio glandular, estroma e endotélio vascular) nos três grupos estudados: controle, endométrio eutópico de paciente com endometriose e lesão endometriótica.....	43
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>Avidin-Biotin Complex</i>
BrdU	5-bromo 2'-deoxiuridina
CAT	Células amplificadoras transitórias
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CT	Célula-tronco
CTDMO	Célula-tronco derivada da medula óssea
CTP	Célula-tronco/progenitora
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FCT	Fator de células-tronco
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
GST	Glutathione-S-transferase
H&E	Hematoxilina e eosina
HC	Hospital das Clínicas
IgG	Imunoglobulina G
IHQ	Imuno-histoquímica
INCT	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
IRS	<i>Immunoreactive score</i>
LRC	<i>Label-retaining cells</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGFR	Receptor do fator de crescimento das plaquetas
pH	Potencial de Hidrogênio
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RR	Risco relativo
SP	<i>Side population</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Fisiopatologia da endometriose.....	19
2.2 Células-tronco.....	21
2.2.1 Células-tronco endometriais.....	25
2.2.2 Marcadores de indiferenciação em células-tronco endometriais.....	28
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4 METODOLOGIA.....	33
4.1 Delineamento do estudo.....	33
4.1.1 Considerações éticas.....	33
4.2 Pacientes.....	33
4.3 Métodos.....	34
4.3.1 Coleta e processamento das amostras.....	34
4.3.2 Imuno-histoquímica.....	34
4.3.2.1 Preparo das lâminas.....	34
4.3.2.2 Considerações técnicas.....	34
4.3.2.3 Procedimento.....	37
4.3.2.4 Leitura da imuno-histoquímica.....	38
4.4 Análise estatística.....	39
5 RESULTADOS.....	40
5.1 Análise das variáveis categóricas para Musashi-1, Oct-4 e c-kit.....	40
5.2 Análise quantitativa de imunocoloração para a proteína Musashi-1.....	43
5.3 Análise quantitativa de imunocoloração para o Oct-4.....	47
5.4 Análise quantitativa da imunocoloração para a proteína c-kit.....	50

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas.

6 DISCUSSÃO.....	53
6.1 Expressão de Musashi-1 no endométrio.....	53
6.2 Expressão de Oct-4 no endométrio.....	54
6.3 Expressão de c-kit no endométrio.....	55
6.4 Considerações finais.....	56
7 CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXOS	65

1 INTRODUÇÃO

A endometriose é doença crônica benigna caracterizada pela presença de tecido glandular e/ou estromal similar ao endométrio fora da cavidade uterina. A incidência dessa afecção varia amplamente de acordo com a população estudada, acometendo 5 a 15% das mulheres em idade reprodutiva e aproximadamente 35 a 50% das pacientes inférteis e/ou com dor pélvica crônica (GAZVANI; TEMPLETON, 2002; JENSEN *et al.*, 2002; VINATIER *et al.*, 2001).

Os sintomas clássicos da endometriose - dor pélvica crônica, dispareunia, disfunções menstruais e infertilidade - causam forte impacto no bem-estar e na saúde das mulheres portadoras dessa afecção (LEYENDECKER; WILDT; MALL, 2009). Proliferação celular, invasão tecidual e neoangiogênese estão presentes nos sítios de implantação de endométrio ectópico e atingem primariamente o peritônio pélvico, mas podem ocorrer em qualquer víscera abdominal, septo retovaginal, pleura, intestinos e, raramente, cérebro (GAZVANI; TEMPLETON, 2002).

A endometriose é afecção poligênica e multifatorial (BULUN, 2009; SIMPSON *et al.*, 1980). O risco relativo (RR) de desenvolver essa desordem é de 3,58 para gêmeas monozigóticas e 2,32 para gêmeas dizigóticas, segundo estudo realizado na Austrália (TRELOAR *et al.*, 1999). As variantes que codificam a glutathione-S-transferase GSTM1 e GSTT1 demonstraram associação consistente com endometriose em revisão sistemática e metanálise, com aumento de 29% do risco de endometriose em mulheres portadoras da deleção do GSTT1. Em relação aos genes que codificam mediadores inflamatórios e às proteínas envolvidas no metabolismo dos esteroides sexuais, em componentes vasculares e remodelação tecidual, não existem evidências consistentes, uma vez que alguns polimorfismos apresentaram associação com a endometriose apenas em populações selecionadas (TEMPFER *et al.*, 2009).

Vários fatores de risco podem predispor ao desenvolvimento da endometriose. A prevalência dessa afecção parece aumentar com a idade até a menopausa, apesar de os estudos mais recentes não confirmarem esse achado (GRUPPO ITALIANO PER LO STUDIO DELL'ENDOMETRIOSI, 1994; HOUSTON *et al.*, 1988). A incidência da endometriose costuma ser mais alta em pacientes de melhor classe social e de raça branca (NEME *et al.*, 2002; SIGNORELLO *et al.*, 1997), assim como em mulheres com menarca

precoce, ciclos menstruais curtos e fluxo intenso (CRAMER *et al.*, 1986; DARROW *et al.*, 1993). O tabagismo pesado pode reduzir o risco de endometriose em função dos reconhecidos efeitos antiestrogênicos do fumo (CRAMER *et al.*, 1986), mas esses dados são limitados e controversos (HOUSTON, 1984; MISSMER; CRAMER, 2003; VIGANÓ *et al.*, 2004). A relação entre álcool, cafeína e dieta rica em gorduras saturadas também é polêmica. Entretanto, atividade física regular parece estar relacionada a baixos níveis de estrogênios e, conseqüentemente, pode reduzir o risco de desenvolvimento dessa desordem (MISSMER; CRAMER, 2003; VIGANÓ *et al.*, 2004).

A patogênese da endometriose, apesar de muito estudada, é ainda pouco entendida, mas é possível que a combinação de diversos processos biológicos aberrantes esteja envolvida (BULUN, 2009). Muitos estudos em biologia molecular têm sido realizados para investigar os mecanismos relacionados à implantação e sobrevivência dos implantes endometriais fora da cavidade uterina (SASSON; TAYLOR, 2008). No processo fisiopatológico da endometriose, fatores tais como imunológicos, reprodutivos, ambientais, anormalidades do trato genital e desreguladores endócrinos parecem ter papel determinante (FRASER, 2008). Nos últimos anos, alguns grupos de pesquisa constataram a existência de células-tronco/progenitoras (CTPs) no endométrio humano (GARGETT, 2007), sugerindo que essas células também poderiam estar envolvidas na fisiopatologia de desordens endometriais proliferativas, como, por exemplo, a endometriose (DU; TAYLOR, 2007; GARGETT; MASUDA, 2010; MARUYAMA *et al.*, 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiopatologia da endometriose

Muitos grupos de cientistas pesquisam os mecanismos fisiopatológicos da endometriose, mas até hoje sua fisiopatologia permanece pouco compreendida (MORSCH *et al.*, 2009). A hipótese proposta por Sampson, em 1927, de que fragmentos de endométrio menstrual poderiam refluir através das tubas uterinas até a cavidade peritoneal, com posterior adesão desses fragmentos e progressão na superfície do peritônio e órgãos pélvicos, é o mecanismo mais amplamente aceito (HALME *et al.*, 1984; SAMPSON, 1922; 1925; 1927). Vários estudos corroboram a menstruação retrógrada, fenômeno observado em 76-90% das mulheres, sendo mais comum naquelas com endometriose. As portadoras dessa desordem têm mais volume de fluxo menstrual retrógrado quando comparadas às mulheres não acometidas. Além disso, pacientes com endometriose têm padrão de contração miometrial anormal. Mulheres com anomalias müllerianas e obstrução cervical ou vaginal apresentam alto risco de desenvolver endometriose precocemente (SASSON; TAYLOR, 2008). Por outro lado, o fato de apenas reduzida parcela de mulheres com menstruação retrógrada desenvolver endometriose sugere a participação de outros fatores adjuvantes. É fator possivelmente envolvido na patogênese dessa afecção: mais viabilidade dos implantes associada a alterações imunológicas e do líquido peritoneal, o que permitiria a adesão, implantação, neovascularização e sobrevivência dos mesmos (CHRISTODOULAKOS *et al.*, 2007).

A metaplasia celômica, outro possível mecanismo proposto para explicar a etiologia da endometriose, envolve a transformação metaplásica espontânea das células mesoteliais derivadas do epitélio celômico localizado no peritônio e na pleura (GRUENWALD, 1942). Essa hipótese baseia-se na origem embriológica comum dos ductos müllerianos, epitélio superficial e peritônio pélvico da parede celômica e torna-se atrativa por poder explicar a ocorrência de endometriose em qualquer localização do corpo, ou mesmo quando acontece antes da menarca, e as raras ocorrências no sexo masculino (MARTIN; HAUCK, 1985; PINKERT; CATLOW; STRAUS, 1979). Esse também parece ser o mecanismo etiológico mais provável no caso de cistos endometrióticos, os quais

surgiriam a partir da metaplasia de uma invaginação do mesotélio nos ovários (MATSUURA *et al.*, 1999).

Os resquícios embrionários dos ductos de Müller também induziriam a formação de tecido endometrial ectópico quando submetidos a determinados estímulos (VON RECKLINGHAUSEN, 1896). A hipótese dos remanescentes embrionários poderia explicar a endometriose no septo retovaginal, bem como em localizações ao longo do trajeto de migração do sistema mülleriano embrionário. Entretanto, esse mecanismo permanece apenas especulativo, uma vez que implicaria a persistência de restos embriológicos até a vida adulta (SASSON; TAYLOR, 2008).

Há mais de 80 anos Sampson também postulou que a disseminação de células endometriais por meio de vasos linfáticos ou sanguíneos também explicaria o aparecimento da endometriose em sítios distantes da pelve, como cérebro, pulmões, linfonodos, extremidades e parede abdominal (SAMPSON, 1927). Embora essa hipótese seja uma explicação plausível para a patogênese dessa afecção, provavelmente não representa o mecanismo primário por que a incidência de endometriose nesses sítios é bastante rara (HONORÉ, 1999).

Defeitos moleculares intrínsecos no endométrio eutópico e ectópico de pacientes com endometriose, tais como expressão aberrante de aromatase ou de fatores de transcrição, também parecem ser mecanismos envolvidos na fisiopatologia dessa afecção. Observações clínicas e evidências laboratoriais sugerem que o estrogênio desempenha importante papel na formação e no desenvolvimento de implantes de endométrio ectópico. Além disso, na endometriose, verifica-se aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento e angiogênese que podem ser responsáveis pela manutenção dessa desordem e pelo comprometimento da função reprodutiva (MORSCH *et al.*, 2009).

Recentemente, a identificação de CTPs endometriais (CHAN; SCHWAB; GARGETT, 2004) despontou como uma nova hipótese fisiopatológica para a endometriose. Esse mecanismo poderia explicar não só todas as situações em que a endometriose acontece, como localizações raras e ocorrências no sexo masculino, mas também seria o pressuposto para todas as outras hipóteses já estudadas: menstruação retrógrada, metaplasia celômica, resquícios embrionários e disseminação linfovascular (FIG. 1) (GARGETT; MASUDA, 2010; MARUYAMA *et al.*, 2010; SASSON; TAYLOR, 2008).

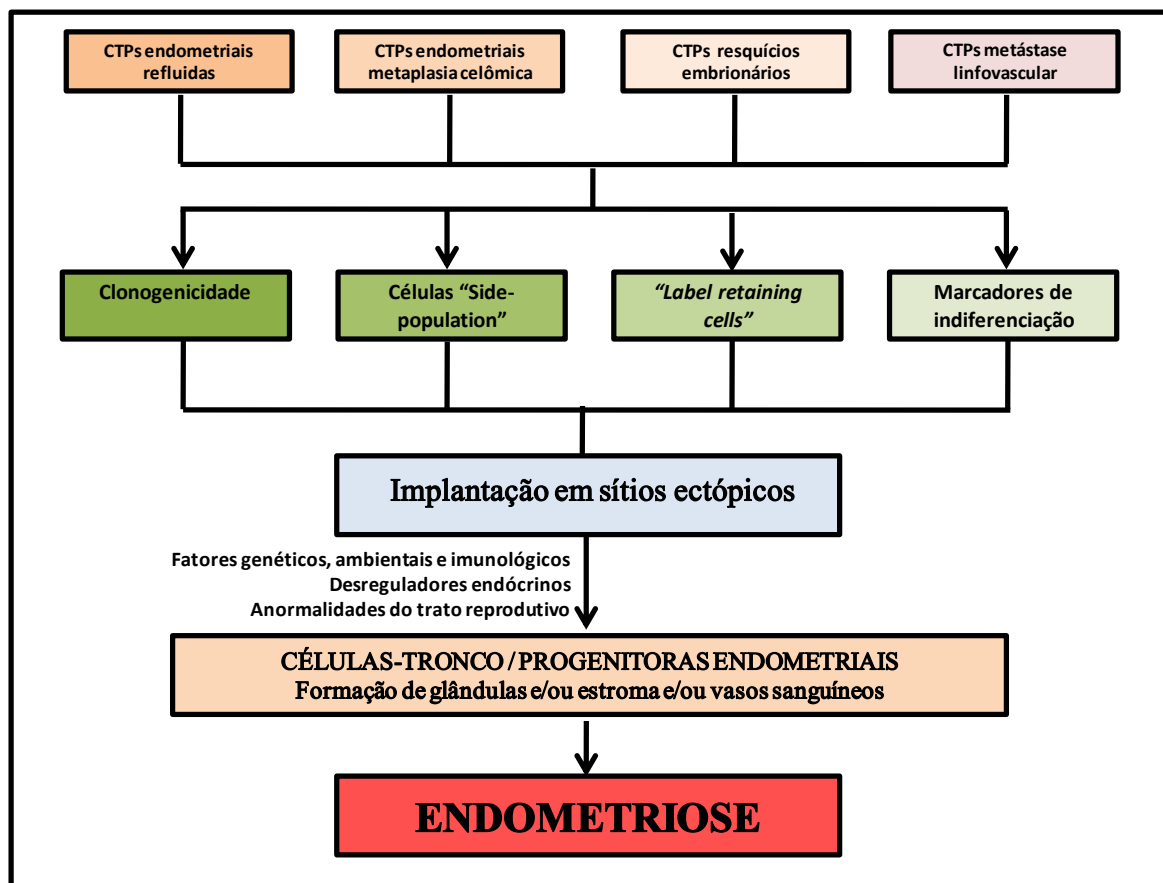


FIGURA 1 – Hipótese das CTPs endometriais como um novo mecanismo fisiopatológico para a endometriose.

Vários mecanismos fisiopatológicos distintos permitem que CTPs endometriais - caracterizadas por vários ensaios: clonogenicidade, células *side population*, *label-retaining cells* e marcadores de indiferenciação - atinjam sítios extrauterinos. As CTPs endometriais submetidas a fatores genéticos, ambientais e imunológicos, desreguladores endócrinos e/ou em anormalidades do trato reprodutivo poderiam diferenciar-se, formando estroma, glândulas e endotélio vascular e culminar em endometriose.

Fonte: Sasson e Taylor (2008).

2.2 Células-tronco

Nos últimos anos, pesquisas envolvendo CTPs geram grande interesse entre cientistas básicos, profissionais de saúde, mídia e público em geral pelo potencial impacto em saúde humana, com a possibilidade de utilização na prevenção, diagnóstico e terapêutica de doenças crônicas e debilitantes, além da sua aplicação em pesquisas básicas (MIMEAULT; BATRA, 2008). As CTPs são definidas por suas propriedades funcionais, em particular sua capacidade de autorrenovação ou produção de células-filhas idênticas à célula-mãe e, ao mesmo tempo, sua capacidade em diferenciar-se em tipos celulares

especializados. Essas células estão presentes durante os estágios de desenvolvimento embrionário, mas também podem ser identificadas em determinados tecidos adultos (DEB *et al.*, 2008; GRITTI; VESCOVI; GALLI, 2002). Enquanto as CTPs provenientes do zigoto são totipotentes, ou seja, possuem a capacidade de gerar qualquer tipo celular embrionário ou extraembrionário, as CTPs adultas são multipotentes (FIG. 2), capazes de produzir múltiplos tipos celulares da mesma linhagem germinativa; ou unipotentes, podem produzir um único tipo celular da mesma linhagem (GRITTI; VESCOVI; GALLI, 2002).

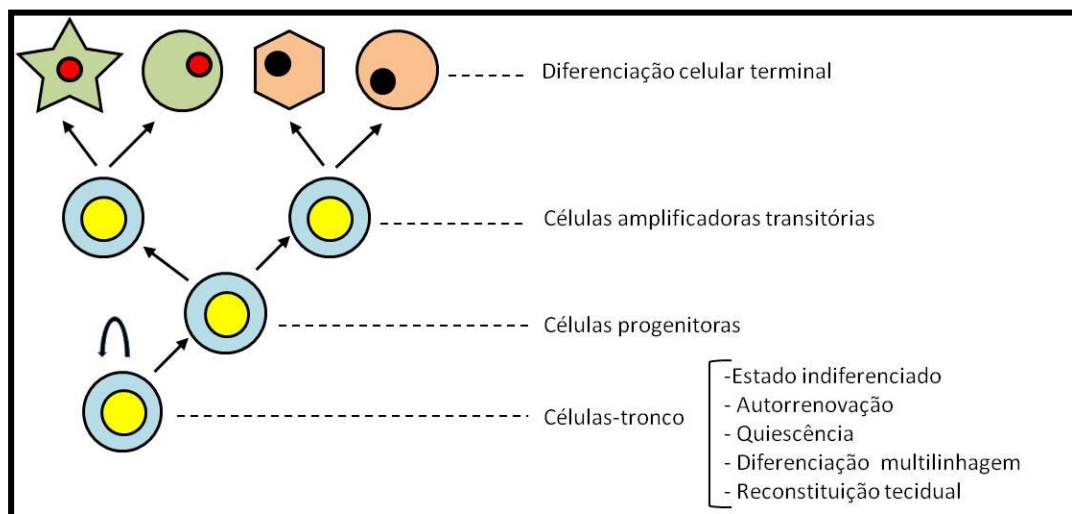


FIGURA 2 – Divisão e diferenciação de células-tronco/progenitoras adultas.

As CTPs localizam-se em nichos e se autorrenovam. Essas células geram células-filhas/progenitoras a partir de divisão celular simétrica e assimétrica. As células-progenitoras dividem-se em células amplificadoras transitórias (CAT), que sofrem rápida expansão e proliferação. As CATs terminam por se diferenciarem em várias células funcionais sem potencial proliferativo.

Fonte: Adaptado, com permissão, de Maruyama (2010). ANEXO A.

As CTPs adultas, ou somáticas, são encontradas em estruturas anatômicas denominadas nichos, microambientes que mantêm a homeostasia – autorrenovação, proliferação, diferenciação e apoptose celular – a partir de sinais intercelulares. À medida que as CTPs geram células progenitoras, inicia-se o processo de diferenciação celular, com a aquisição de moléculas próprias de estágios diferenciados e a perda de outras características de estágios indiferenciados (GRITTI; VESCOVI; GALLI, 2002). Nos últimos anos, as CTPs somáticas foram identificadas em diversos tecidos e órgãos, incluindo medula óssea, mama, próstata, cérebro, fígado (LI; CLEVERS, 2010) e, mais recentemente, no endométrio (CHAN; SCHWAB; GARGETT, 2004).

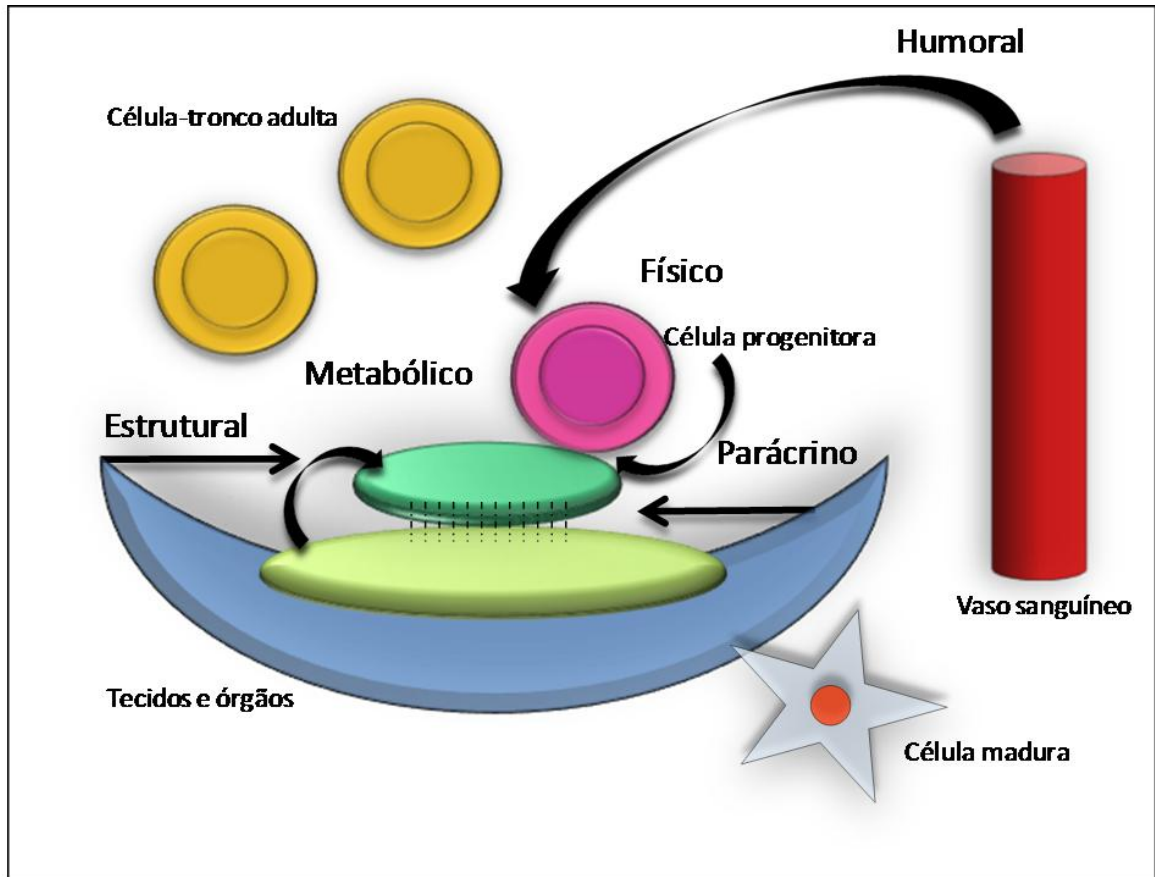


FIGURA 3 – Estrutura dos nichos de CTPs.

Sítio onde as CTPs localizam-se em tecidos adultos e mantêm a homeostasia por ações humorais, físicas, estruturais, metabólicas e parácrinas.

Fonte: Gritti, Vescovi e Galli (2002).

Uma vez que as CTPs são um “tipo celular novo” e de difícil identificação, múltiplos ensaios são utilizados e testados para caracterizá-las (GRITTI; VESCOVI; GALLI, 2002; VAN OS *et al.*, 2004). Os ensaios *in vitro* incluem aqueles que demonstram o potencial de clonogenicidade, proliferação e diferenciação celular, bem como as características fenotípicas dessas células. Por outro lado, os ensaios *in vivo* incluem a reconstituição tecidual e a demonstração de *label-retaining cells* (LRCs) (SASSON; TAYLOR, 2008).

Ensaio *in vitro* para caracterização de células-tronco (CT) podem detectar a clonogenicidade, habilidade que uma única célula tem de formar clones quando cultivada em meio de baixa densidade celular, além de permitir avaliar a expressão de marcadores celulares de indiferenciação. A determinação do potencial proliferativo das supostas CTPs, que também é um ensaio *in vitro*, consiste na identificação de CTPs a partir de sua

capacidade de autorregeneração – divisão celular simétrica – e, simultaneamente, gerar células-filhas diferentes da célula-mãe – divisão celular assimétrica. Uma forma de avaliar esse potencial é cultivar a suposta CTP em meios contendo fatores de crescimento específicos, em que ocorre a expansão clonal por etapas, sendo que à medida que a célula se diferencia, ela consegue se manter por um baixo número de passagens quando comparada à célula-mãe (CERVELLÓ *et al.*, 2007; CERVELLÓ; SIMON, 2009; MARUYAMA *et al.*, 2010; SASSON; TAYLOR, 2008).

In vivo, o ensaio de reconstituição tecidual compreende uma série de experimentos em que o tecido de interesse se reconstitui em um animal receptor após transplante de CTPs doadas, sendo considerado o padrão-ouro para a caracterização desse grupo celular (JOSEPH; MORRISON, 2005). Já o ensaio com LRCs é uma técnica que identifica *in vivo* uma suposta população de CTPs em estado quiescente quando marcadores moleculares específicos não são conhecidos. As LRCs “rotulam” células proliferativas com alta síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) a partir da marcação com 5-bromo 2'-deoxiuridina (BrdU), por exemplo. A cada divisão celular o BrdU tem sua concentração celular reduzida em 50%, tornando-se indetectável após aproximadamente três a quatro divisões. A imunohistoquímica (IHQ) localiza as LRCs BrdU⁺, revelando sua localização, ou seja, o nicho das CTPs no tecido de interesse (CHAN; GARGETT, 2006; GARGETT; MASUDA, 2010).

A identificação de células *side-population*, que se tornou um marco importante no estudo de células-tronco, especialmente pela possibilidade de isolamento físico dessas células com luz ultravioleta ou fluorescência, é outra abordagem empregada para isolar e caracterizar CTPs somáticas de múltiplos tecidos. Essa técnica baseia-se no princípio de que tais células, por possuírem o transportador transmembrana *ATP-binding cassette transporte G2* (ABCG2), excluem corantes lipofílicos antimetabólicos, como, por exemplo, o corante DNA específico *Hoechst 33342*, e adquirem o aspecto *side population* (SP) durante o procedimento de clonagem celular por citometria de fluxo (GOODELL *et al.*, 1996; HIRSCHMANN-JAX *et al.*, 2004).

Em relação aos marcadores da CTP adulta, ainda não foi identificada alguma molécula totalmente específica, apesar de existirem inúmeras pesquisas nessa área. A identificação de um painel de marcadores moleculares para esse fim seria de extrema importância para a caracterização de CTPs adultas em estado quiescente (SOUZA *et al.*, 2003). Contudo, até o momento, essas células são caracterizadas fenotipicamente pela expressão de marcadores típicos de linhagens indiferenciadas e progenitoras e pela

ausência de marcadores de tipos celulares mais diferenciados (GRITTI; VESCOVI; GALLI, 2002; SOUZA *et al.*, 2003).

2.2.1 Células-tronco endometriais

Atualmente, alguns estudiosos pesquisam a CTPs em endométrio humano e em modelos experimentais, além de sua correlação com a regeneração endometrial e a ciclicidade menstrual. O tecido endometrial é conhecido pela sua dinâmica de autorrenovação, quando a cada ciclo estral de roedores e menstrual em humanos sofre regeneração (SASSON; TAYLOR, 2008). Esse *turnover* celular é similar ao que ocorre em determinados tecidos altamente regenerativos, como medula óssea, epiderme e epitélio intestinal (GARGETT; MASUDA, 2010). Há alguns anos, postulou-se que o processo de regeneração celular endometrial poderia ser dependente de CTPs localizadas em nichos específicos da camada basal e funcional do endométrio e que essas células, quando submetidas a determinados estímulos, como altas concentrações de estradiol e fatores de crescimento, poderiam migrar para outras localizações e gerar grupos de células progenitoras com o potencial de diferenciação em outros tipos celulares epiteliais e estromais, além de componentes vasculares (MASUDA *et al.*, 2010; SASSON; TAYLOR, 2008).

Em 1991, Padykula referiu que CTPs fetais persistentes no útero adulto poderiam reconstituir o epitélio glandular e estromal que descama a cada ciclo menstrual e gravídico-puerperal. Até 2004 não existiam evidências científicas que justificassem essa hipótese. Naquele ano, dois estudos de diferentes laboratórios foram publicados fornecendo as primeiras evidências desse fato. Chan, Schwab e Gargett (2004) demonstraram que o endométrio humano possui reduzido grupo de células que exibe capacidade clonogênica. Os resultados desse grupo de pesquisadores mostraram que baixo percentual de células epiteliais (0,22%) e estromais (1,25%) iniciou a formação de colônias em meio livre de soro e enriquecido com fatores de crescimento e apresentou alto potencial de proliferação celular (CHAN; SCHWAB; GARGETT, 2004). Por outro lado, ainda em 2004, Taylor comprovou que, em humanos, células de medula óssea transplantadas poderiam participar do processo de regeneração endometrial em pacientes receptoras.

O estudo desenvolvido em 2005 por Schwab, Chan e Gargett relatou que o potencial de clonogenicidade das células epiteliais e estromais do endométrio humano não difere entre as fases do ciclo menstrual e a atividade endometrial. Como o endométrio inativo contém somente células da camada basal e não endométrio funcionante, esses

dados sugerem que as supostas CTPs localizam-se nessa camada e persistem mesmo após a menopausa (SCHWAB; CHAN; GARGETT, 2005).

Kim, Tavaré e Shibata (2005) revelaram que o padrão de metilação de genes em glândulas de endométrio humano também reforça a hipótese de CTPs epiteliais como possível fonte precursora de células endometriais. Os marcadores epigenéticos adquiridos durante a divisão celular de CTPs adultas são herdados pelas células-filhas e persistem, enquanto aqueles herdados a partir de células maduras são perdidos na camada funcional durante a descamação endometrial. O número de divisões celulares que uma CTP sofreu pode ser inferido a partir do número de marcadores epigenéticos acumulados dentro dessas glândulas (RO; RANNALA, 2001). Os estudos indicam, ainda, que a extensão de metilação dos genes das glândulas endometriais aumenta com a idade até a menopausa e permanece relativamente constante após. Assim, as marcas epigenéticas são reflexo da atividade mitótica das CTPs, sendo que a divisão celular assimétrica é responsável pela manutenção do “estoque” das CTPs nos nichos glandulares endometriais em número relativamente constante (KIM; TAVARÉ; SHIBATA, 2005).

Em 2006, o grupo liderado por Gargett identificou LRCs no estroma e epitélio endometrial de camundongos, fornecendo novas evidências para a hipótese anteriormente lançada de que as CTPs desempenham importante papel no processo de renovação endometrial (CHAN; GARGETT, 2006). Posteriormente, *Cervelló et al.* reportaram a coexpressão dos marcadores de indiferenciação c-kit e Oct-4 em LRCs endometriais de camundongos (CERVELLÓ *et al.*, 2007). As LRCs foram identificadas no epitélio glandular, no estroma e no miométrio em diferentes proporções, com redução do percentual dessas células na medida da aquisição da maturidade dos animais. Com o emprego de técnicas de IHQ, a maioria dos nichos de CTPs endometriais de camundongos foi localizada na transição entre endométrio e miométrio, com 30% dos mesmos em *loci* perivascular (CHAN; GARGETT, 2006).

Um grupo de pesquisadores identificou e caracterizou células SP no endométrio humano, ressaltando que tais células exibem comportamento de CTPs, com a capacidade de autorrenovação (>24 semanas) e de diferenciação celular (KATO, *et al.*, 2007). Esses dados foram posteriormente complementados por Masuda *et al.* (2007; 2010), que observaram a capacidade regenerativa e de angiogênese de células SP endometriais em um ensaio de regeneração *in vivo*, no qual células endometriais SP foram xenotransplantadas sob a cápsula renal de camundongos NOD/SCID/ γ_c^{null} (NOG), uma nova geração de camundongos gravemente imunocomprometidos, com deficiências de atividade de células

B, T e *natural killer*. A partir de então, outras equipes de pesquisadores enfatizaram que essas células apresentam também características multipotentes quando cultivadas em meios específicos de diferenciação celular: Kato *et al.* (2007) descreveram a diferenciação em células endometriais glandulares e estromais; Schwab e Gargett (2007) observaram a transdiferenciação de CTPs endometriais em quatro linhagens distintas – adipócitos, células de músculo liso, condrócitos e osteoblastos; Wolff *et al.* (2007) obtiveram condrócitos a partir de células-tronco endometriais humanas (KATO *et al.*, 2007; SCHWAB; GARGETT, 2007; WOLFF *et al.*, 2007).

Recentemente, Ikegami *et al.* (2010) também verificaram, em cultivo celular, a transdiferenciação de células mesenquimais endometriais e menstruais em cardiomiócitos. As células cardíacas transdiferenciadas apresentaram o fenótipo, a eficiência e as propriedades fisiológicas esperadas para cardiomiócitos. Por último, um grupo de pesquisadores relatou a obtenção de neurônios produtores de dopamina em culturas derivadas de células endometriais, representando potencial futuro para o tratamento da doença de Parkinson (WOLFF *et al.*, 2010).

Estudos com medula óssea sugeriram, ainda, que esta também poderia ser uma fonte alternativa de CTPs endometriais. Tal hipótese baseia-se no pressuposto de que células-tronco derivadas da medula óssea (CTDMOs) circulantes são capazes de se diferenciar em múltiplos tipos celulares, incluindo células endoteliais, hepatócitos, neurônios, células da pele, cardiomiócitos e epitélio gastrointestinal. Após transplante de medula óssea, as técnicas de ablação endometrial apresentam taxa substancialmente alta de falha, com possibilidade de reconstituição do endométrio normal. Além disso, estudos revelaram a presença de quimerismo glandular e estromal no endométrio de pacientes receptoras, sugerindo que CTDMOs podem contribuir para a repopulação do endométrio dessas pacientes. Em pesquisa, o percentual de quimerismo foi de 0,2 a 48% e correlacionou-se com o período de tempo decorrido entre o transplante e a biópsia endometrial. Entretanto, o tamanho da amostra incluída nesse estudo foi muito reduzido para determinar com clareza o período de tempo necessário para que ocorresse repopulação endometrial por CTDMOs (TAYLOR, 2004).

Um grupo de pesquisadores da Universidade de *Yale* investigou, em 2007, a capacidade das CTDMOs de repopular o endométrio normal e gerar endometriose. Para isso, eles utilizaram dois grupos de camundongos fêmeas e um grupo de machos: 10 fêmeas *LacZ* transgênicas, 10 fêmeas sem manipulação genética e 10 machos *LacZ* transgênicos. Como doadores de CTDMOs, foram empregados os machos *LacZ*. As

fêmeas foram submetidas à indução experimental de endometriose, como já descrito na literatura (GRÜMMER, 2006), sendo que os tecidos endometriais utilizados nos implantes foram trocados: fêmeas *LacZ* receberam implantes de endométrio de fêmeas sem manipulação genética e fêmeas sem manipulação genética receberam implantes de endométrio de fêmeas *LacZ*. Para confirmar a origem endometrial das CTDMOs em endométrio e tecido ectópico dos implantes, foram empregadas as técnicas de *polymerase chain reaction* (PCR) e *fluorescent in situ hybridization* (FISH), com a identificação do cromossoma Y. Concluiu-se que as CTDMOs podem contribuir não só para manter a homeostasia do endométrio normal durante a reconstituição tecidual fisiológica, mas também para a patogênese da endometriose (DU; TAYLOR, 2009).

Posteriormente, Mints *et al.* (2008) pesquisaram a participação de CTDMOs na angiogênese, processo caracterizado pelo desenvolvimento de novos microvasos a partir de uma rede sanguínea já existente, endometrial, que têm importante papel na fisiopatologia da endometriose. Eles avaliaram se CTDMOs poderiam ser detectadas em vasos sanguíneos endometriais de humanos e camundongos fêmeas após transplante de CTDMOs de homens e camundongos machos, respectivamente. Pela IHQ, as células que expressaram CD34 e VEGFR2 (receptor tipo 2 do VEGFR - *vascular endothelial growth factor*) foram imunofenotipadas como células endoteliais, enquanto pela técnica de FISH as sondas para o cromossoma XY foram empregadas para identificar as células dos doadores. Os resultados demonstraram quimerismo vascular endometrial tanto em humanos quanto em camundongos, sugerindo a participação de CTDMOs também na angiogênese endometrial (MINTS *et al.*, 2008).

2.2.2 Marcadores de indiferenciação em células-tronco endometriais

As pesquisas com marcadores celulares em CTPs endometriais têm resultados controversos. Alguns pesquisadores identificaram moléculas próprias dessa linhagem celular no endométrio humano e de animais (BENTZ *et al.*, 2010; CERVELLÓ *et al.*, 2007; CHO *et al.*, 2004; FORTE *et al.*, 2009; GÖTTE *et al.*, 2008; MATTHAI *et al.*, 2006; SCHWAB; GARGETT, 2007), enquanto outros sugeriram a presença de CTPs endometriais por meio de outras técnicas, porém não identificaram marcador de indiferenciação específico (CHAN; GARGETT, 2006; CHAN; SCHWAB; GARGETT, 2004). Vários marcadores são utilizados para tentar caracterizar os estágios de

indiferenciação, sendo que o Oct-4 (BENTZ *et al.*, 2010; CERVELLÓ *et al.*, 2007;), c-Kit (CHO *et al.*, 2004; CERVELLÓ *et al.*, 2007; MATTHAI *et al.*, 2006), CD-146 (SCHWAB; GARGETT, 2007), SALL4 (FORTE *et al.*, 2009), telomerase, Musashi-1 e Notch-1 foram identificados em células endometriais (GÖTTE *et al.*, 2008).

Alguns dos marcadores celulares mais bem estabelecidos e estudados em pesquisas sobre células-tronco são o Oct-4 e o c-kit. O Oct-4 é um fator de transcrição nuclear com homeodomínio da família POU (POU5F1 – domínio POU, classe 5, fator de transcrição 1). Essa proteína está diretamente envolvida no processo de autorrenovação de células indiferenciadas e, por isso, é frequentemente utilizada como molécula característica desse grupo celular, inclusive em células-tronco embrionárias. Sua expressão está restrita às células pluripotentes e sua *down-regulation* está associada à perda da pluripotencialidade e à diferenciação celular (PESCE; SCHÖLER, 2001). No endométrio humano, a expressão de Oct-4 foi identificada (MATTHAI *et al.*, 2006), sendo que Bentz *et al.* (2010) compararam as fases proliferativa e secretora (BENTZ *et al.*, 2010).

O c-kit (CD 117), receptor de fator de células-tronco (FCT), tem sido amplamente aceito como um distinto marcador de CTPs hematopoéticas. É uma proteína da família do receptor tirosina-quinase, intimamente relacionada ao receptor do fator de crescimento das plaquetas (PDGFR) e que desempenha importante papel na divisão celular de células imaturas (SOGO *et al.*, 1997). A ativação do c-kit regula uma variedade de respostas biológicas (FIG. 4), incluindo quimiotaxia, proliferação, apoptose e aderência celular (LYMAN; JACOBSEN, 1988). Mutações no c-kit são essenciais para a progressão e crescimento de determinados tumores, hematopoiese, melanogênese e gametogênese. Em estudo preliminar, Osuga *et al.* (2000) preconizaram o envolvimento do eixo FCT/ c-kit na endometriose a partir da avaliação de líquido peritoneal de pacientes com endometriose. Posteriormente, nichos de supostas CTPs foram identificados no endométrio sadio pela marcação por IHQ para a molécula c-kit (CHO *et al.* em 2004) e em tecido endometriótico (UZAN *et al.*, 2005).

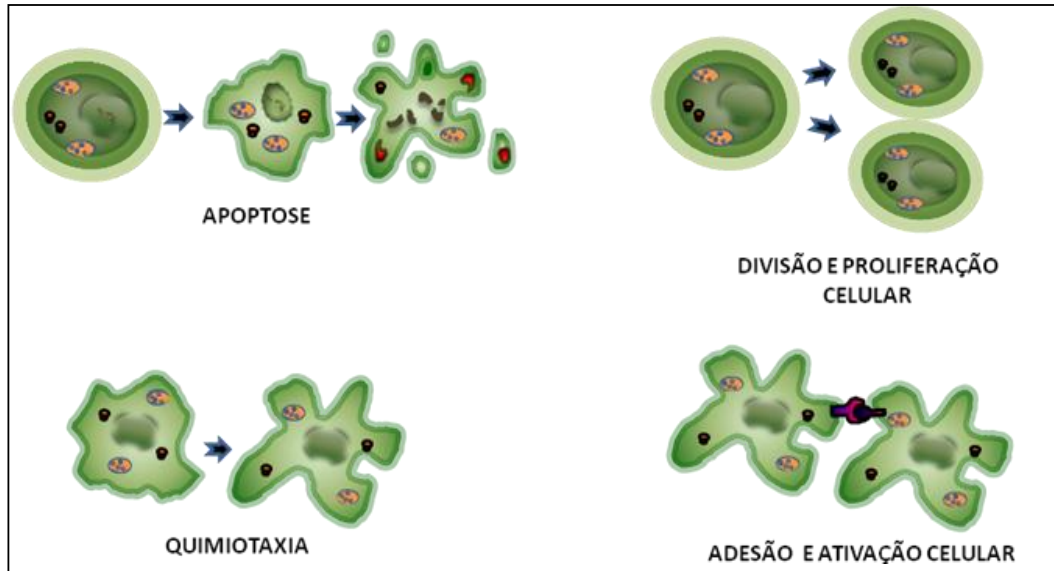


FIGURA 4 – Atividades reguladas pela proteína c-kit.

Fonte: Lyman e Jacobsen (1988).

Em 2005, foi identificada em CTPs neurais a expressão de Musashi-1, uma proteína ligada ao ácido ribonucleico (RNA), que contribui para a autorrenovação de células progenitoras, aumentando o sinal de transdução do Notch-1. A proteína Musashi-1 está associada à manutenção da divisão celular e à divisão celular assimétrica dessas CTPs. Essa molécula é candidata promissora a um novo marcador de CTPs endometriais e está expressa normalmente no epitélio progenitor da mucosa gástrica, glândulas mamárias, epiderme e folículo piloso (GÖTTE *et al.*, 2008). Por outro lado, o Notch-1 é um receptor transmembrana que controla o destino celular por meio de interações celulares próximas e é positivamente modulado pela Musashi-1 (FIG. 5) (COBELLIS *et al.*, 2008; GÖTTE *et al.*, 2008; OKANO *et al.*, 2005). Recentemente, Götte *et al.* (2008) identificaram a proteína Musashi-1 e o Notch-1 no endométrio, no carcinoma endometrial e na endometriose humana. Nessas afecções a expressão foi maior que no tecido sadio, traduzindo uma possível correlação entre as CTPs e a fisiopatologia de doenças endometriais proliferativas.

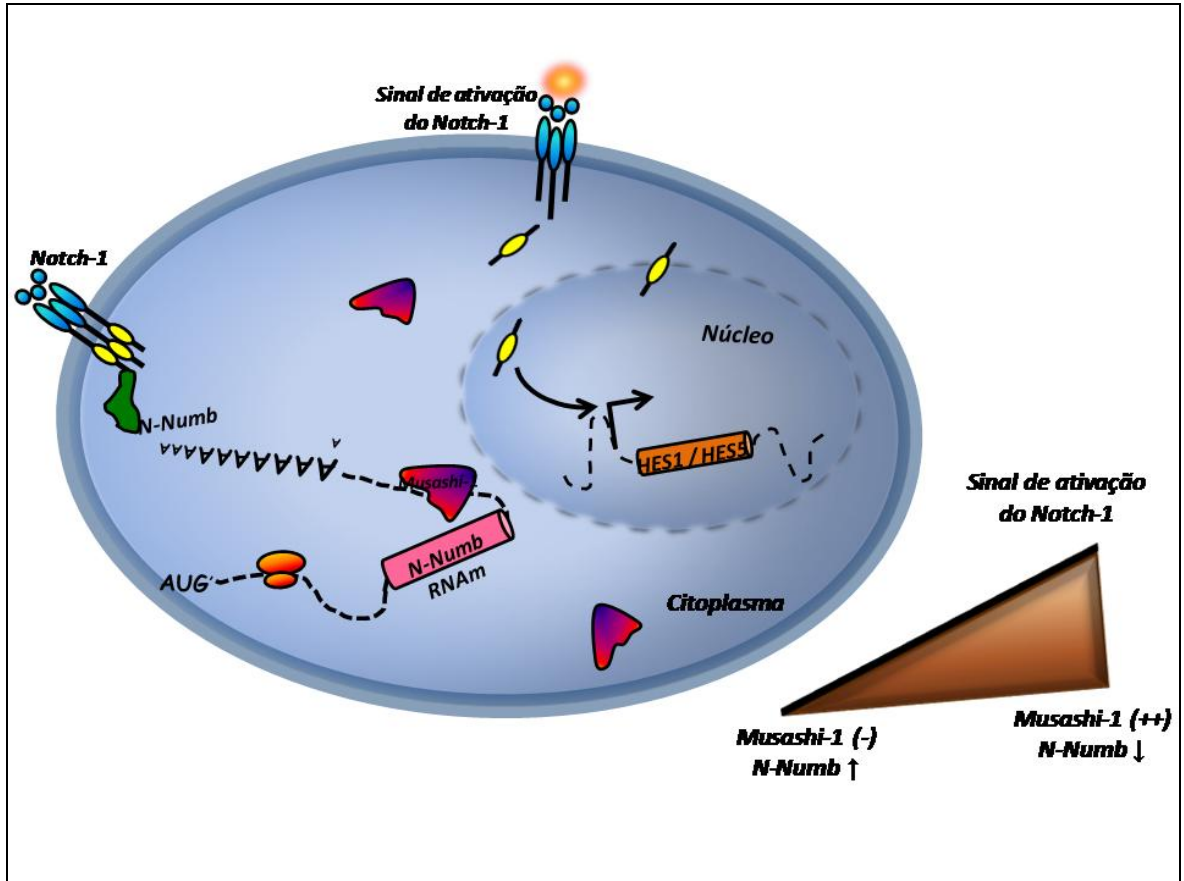


FIGURA 5 - Mapa do receptor Notch-1 e sua interação com a proteína Musashi-1.

O Notch-1 é um receptor transmembrana que é continuamente inibido pelo N-Numb. Quando a Musashi-1 está expressa, ocorre inibição do N-Numb, com consequente ativação do Notch-1. Quando o Notch-1 recebe estímulo extracelular e não está negativamente modulado pelo N-Numb, seu domínio interno é liberado e, no núcleo, age como fator de transcrição.

Fonte: Okano *et al.* (2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

As CTPs podem ser identificadas pela associação de ensaios com metodologias diferentes ou pela identificação simultânea de vários marcadores celulares de estágio indiferenciado. Baseado nesse pressuposto, este estudo pretende:

- Avaliar a expressão dos marcadores celulares de indiferenciação Musashi-1, Oct-4 e c-kit no endométrio ectópico de mulheres com endometriose e no endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever a localização celular e nos compartimentos tissulares endometriais predominante para os marcadores Musashi-1, Oct-4 e c-kit tecidos endometriais ectópico e eutópico por grupos e no global de amostras.
- Identificar os nichos das supostas CTPs no endométrio eutópico de pacientes saudáveis e no endométrio eutópico e ectópico de pacientes com endometriose.
- Avaliar a intensidade de expressão e a prevalência dos marcadores Musashi-1, Oct-4 e c-kit no endométrio de mulheres saudáveis em comparação com o endométrio eutópico de mulheres com endometriose e suas respectivas lesões endometrióticas.
- Definir se os dados desta pesquisa reforçam as evidências atuais para as CTPs como um novo mecanismo fisiopatológico para a endometriose.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento do estudo

Estudo transversal controlado

4.1.1 Considerações éticas

Este experimento foi previamente submetido à apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG) sob o parecer nº ETIC 0628.0.203.000-09 em 15 de março de 2010 (ANEXO B), como subprojeto do estudo intitulado “Subunidade alfa da inibina e seu correceptor betaglicano em lesões endometrióticas”.

4.2 Pacientes

O estudo incluiu amostras de endométrio eutópico de mulheres no menacme submetidas a histerectomia por diversas indicações médicas (n=4) e exemplares de tecido endometriótico e de endométrio eutópico de pacientes que se submeteram a procedimento cirúrgico para tratamento de endometriose profunda infiltrativa com acometimento intestinal (n=6). Os critérios de exclusão foram pacientes portadoras de pólipos/hiperplasia endometrial, pacientes que estavam em tratamento hormonal ou em supressão nos últimos seis meses e amostras de qualidade insatisfatória para avaliação microscópica à coloração com hematoxilina e eosina (H&E). Também foram excluídas do grupo em estudo pacientes cujo exame anatomopatológico não confirmou o diagnóstico de endometriose.

4.3 Métodos

4.3.1 Coleta e processamento das amostras

As amostras de endométrio eutópico de pacientes sem endometriose foram obtidas por ressecção em peça cirúrgica imediatamente após a histerectomia. Já as amostras de tecido endometriótico ectópico foram originadas de tecidos macroscopicamente acometidos pela doença e removidos durante procedimento cirúrgico. Nessa ocasião, também foram coletados exemplares de endométrio eutópico das pacientes com endometriose por aspiração intrauterina. As amostras de tecidos foram imediatamente fixadas por imersão em solução de formalina a 10% e, depois de oito a 24 horas, foram incluídas em blocos de parafina. Para todas as amostras foi confeccionada uma lâmina corada com H&E. Essas lâminas foram avaliadas quanto à qualidade do material obtido, sendo excluídos os cortes cuja qualidade do material pudesse dificultar a avaliação após o processo de IHQ.

4.3.2 Imuno-histoquímica

4.3.2.1 Preparo das lâminas

Os espécimes emblocados em parafina foram submetidos a cortes de 4 a 5 μm de espessura e montados em lâminas de vidro previamente limpas e preparadas com organossilano (3-aminopropiltrietoxi-silano; Sigma Chemical Co[®], St. Louis, MO, USA) para a realização da técnica de IHQ.

4.3.2.2 Considerações técnicas

A IHQ frequentemente é empregada como ferramenta útil na pesquisa biomédica e no diagnóstico histopatológico de doenças. O princípio básico desse método molecular baseia-se na identificação de antígenos teciduais ou celulares por anticorpos específicos. Uma vez ocorrida a reação antígeno-anticorpo, a mesma é demonstrada por coloração

visualizada ao microscópio óptico ou por fluorocromos à luz ultravioleta (RAMOS-VARA, 2005).

O método imuno-histoquímico mais amplamente difundido no diagnóstico patológico é o complexo avidina-biotina (*Avidin-Biotin Complex - ABC*), que envolve a aplicação de um anticorpo secundário biotinizado - este seguido pelo ABC -, o que produz alta intensidade de coloração (FIG. 6) (VOSSE *et al.*, 2007). Entretanto, existem muitas limitações características desse método, como a coloração de *background*, que pode ocorrer em função da biotina endógena de determinados tecidos. Além disso, a recuperação antigênica induzida pelo calor pode reativar ainda mais a biotina endógena, causando também esse artefato de coloração. Por outro lado, os métodos para bloqueio da biotina endógena são apenas parcialmente eficazes e acrescentam mais uma etapa a um procedimento já complexo. As limitações dos sistemas tradicionais de IHQ relativas à coloração de *background* são intensificadas em cortes de tecidos congelados, nos quais os níveis de biotina endógena são ainda mais altos do que aqueles encontrados em espécimes embebidos em parafina (RAMOS-VARA, 2005; RAMOS-VARA; MILLER, 2006).

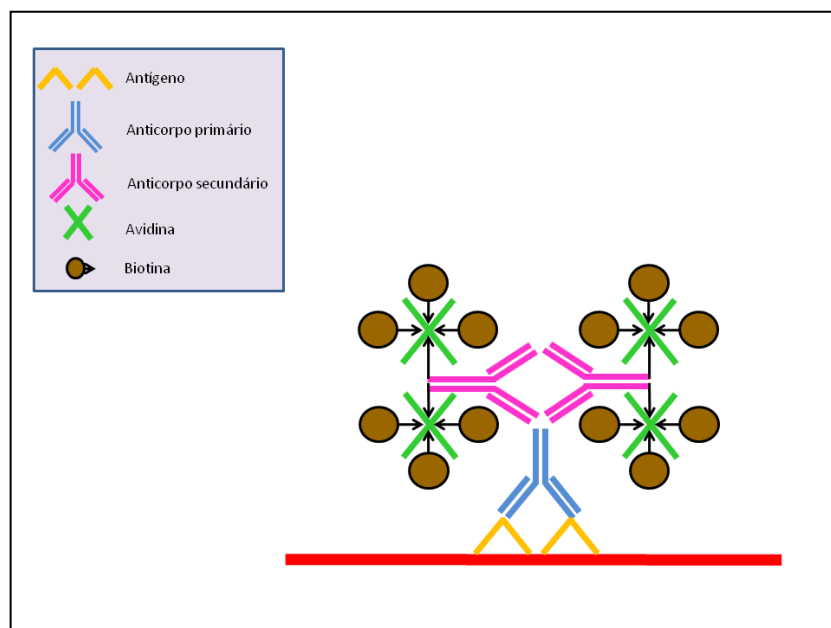


FIGURA 6 - Esquema de IHQ pelo método ABC.

O antígeno tecidual ou celular é reconhecido pelo anticorpo (Ac) primário. Ao Ac primário liga-se um Ac secundário com a avidina. As moléculas de biotina conectam-se a esse complexo (ABC) e produzem um efeito amplificador. Os sítios antigênicos coram-se pelo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) após reação com a peroxidase.

Fonte: Vosse *et al.* (2007).

Nos últimos anos, os sistemas não biotinilados que utilizam polímeros ganharam popularidade por não possuírem as mesmas limitações que o ABC. A técnica de amplificação por polímeros utiliza tecnologia única em que um cerne de Dextran com anticorpos, primários ou secundários, e moléculas de enzimas estão conjugados. Quando no cerne de polímeros os anticorpos conjugados são os primários, apenas limitado número de antígenos pode ser identificado. Já no sistema de polímeros não biotinilados de duas etapas, o cerne de Dextran contém enzimas conjugadas a anticorpos secundários imunoglobulina G (IgG) anticamundongo ou anticoelho universais, permitindo a identificação de maior número de antígenos (FIG. 7). Na prática, a utilidade desse sistema mostrou-se igual ou superior aos sistemas convencionais, com redução de artefatos que podem levar a resultados falso-positivos (DAKO EDUCATION GUIDE, 2006; VOSSE *et al.*, 2007).

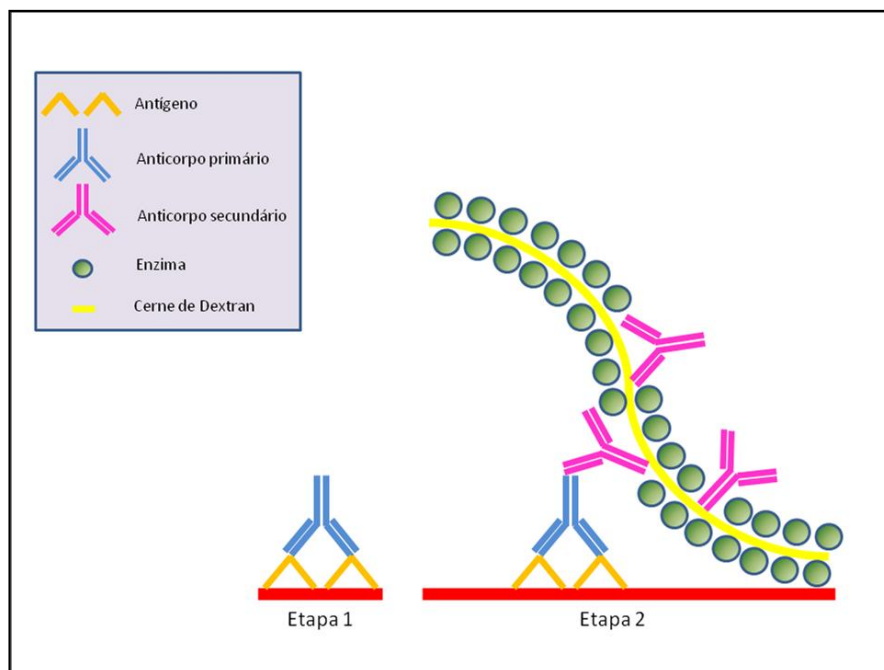


FIGURA 7 - Esquema do sistema de polímeros da IHQ em duas etapas.

1ª etapa - O antígeno tecidual ou celular é reconhecido pelo Ac primário. 2ª etapa - Ao Ac primário liga-se um Ac secundário conectado a um cerne de polímero (Dextran) com múltiplas enzimas.

Fonte: Dako Education Guide (2006).

4.3.2.3 Procedimento

Após incubação das lâminas por 24 horas em estufa a 56°C para melhor aderência dos tecidos às lâminas, as mesmas foram submetidas ao processo de desparafinização, em xileno, e reidratadação, em série de soluções de álcoois em concentrações decrescentes (FIG. 8). A recuperação antigênica induzida pelo calor foi realizada em *steamer* (98° a 100°C) por 45 minutos, para melhor exposição dos epitopos de interesse, utilizando tampão *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (EDTA) (potencial de Hidrogênio - pH 8,0) para Oct-4 e c-kit e tampão citrato (pH 6,0) para Musashi-1.

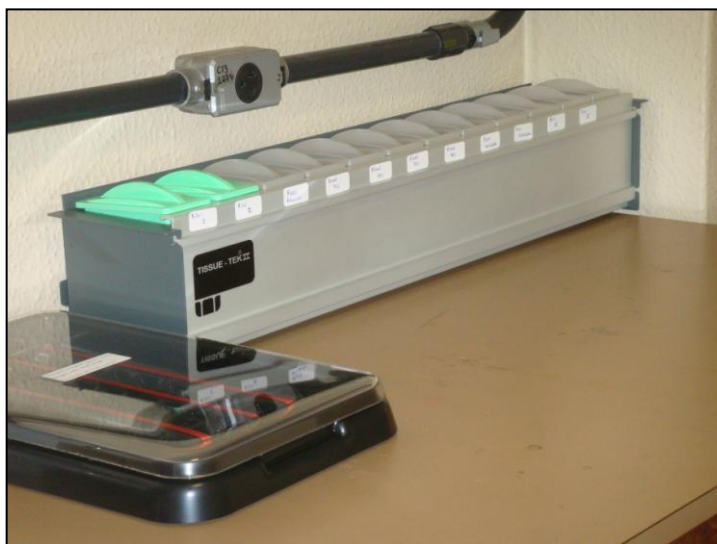


FIGURA 8 - Sistema de coloração manual para desparafinização, desidratação e reidratação de lâminas e câmara úmida de IHQ.

Fonte: Laboratório de Reprodução Humana Prof. Aroldo Fernando Camargos – Hospital das Clínicas (HC) – UFMG.

Todas as etapas da IHQ foram realizadas com os reagentes do sistema de amplificação por polímeros não biotinilados Novolink (Novocastra[®], New Castle Upon Tyne, UK). A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada com o *peroxidase block* por cinco minutos. Para reduzir a coloração de *background*, as secções foram incubadas por cinco minutos com o *protein block*. Os cortes foram posteriormente incubados com os anticorpos primários policlonais de coelho adquiridos da Abcam[®] (Cambridge, Reino Unido) nas seguintes diluições: Oct-4 - 1:50; c-kit – 1:50 e Musashi-1 – 1:100. Após a incubação com os anticorpos primários por 60 minutos à temperatura ambiente em câmara

úmida, a cada lâmina foi aplicado o *post primary block* por cinco minutos e o polímero para coloração amplificada. Para a revelação das reações, foram utilizadas DAB e contracoloração com hematoxilina de Harris do próprio sistema Novolink.

Como controle positivo dos anticorpos Musashi-1, Oct-4 e c-kit foram empregados cortes de tecido intestinal humano. Para controle negativo, foram usadas duas lâminas de endométrio eutópico de paciente saudável, sendo que em uma delas houve a omissão do anticorpo primário e na outra foi realizada a incubação com soro normal de coelho (*normal rabbit IgG* - 0,1 mg/mL - Calbiochem® - Darmstadt, Germany) na diluição de 1:100.

4.3.2.4 Leitura da imuno-histoquímica

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Olympus CX31 por dois examinadores independentes, considerando-se a mediana de escore entre eles. O percentual de células positivas foi estimado de forma semiquantitativa em aumento de 40X. As secções coradas foram pontuadas para cada marcador avaliado de acordo com o escore de imunorreatividade (*immunoreactive score – IRS*) descrito por Remmele e Stegner (1987) e validado no endométrio humano para o anticorpo Oct-4 (BENTZ *et al.*, 2010). O IRS resulta da multiplicação de um escore de intensidade da coloração (negativo = 0; fraco = 1; moderado = 2; forte = 3) pelo escore de percentual de células imunopositivas (nenhuma coloração = 0; 1-10% de células coradas = 1; 11 – 50% de células coradas = 2; 51-80% de células coradas = 3; 81-100% das células coradas = 4).

As lâminas também foram avaliadas de forma descritiva para cada marcador em estudo (Musashi-1, Oct-4 e c-kit), visando à identificação do padrão de marcação celular predominante (nuclear, transmembrana e/ou citoplasmático) e a localização por compartimento endometrial (glandular, estromal e endotelial vascular). Os examinadores também avaliaram os marcadores quanto ao padrão de imunocoloração por grupamentos celulares (nichos).

4.4 Análise estatística

As variáveis categóricas, presença ou ausência de coloração nos compartimentos endometriais (glândula, estroma e endotélio vascular), na membrana celular, no citoplasma e no núcleo, foram analisadas pelo teste do qui-quadrado, corrigido pela razão de verossimilhança (*likelihood ratio test*).

As escalas de imunorreatividade analisadas (intensidade e percentual de células coradas e IRS) foram avaliadas por análise de variância não paramétrica (teste de Kruskal-Wallis) para comparação entre os três grupos de amostras (controle, endométrio eutópico de paciente com endometriose e lesão endometriótica). O teste de Wilcoxon para comparação não paramétrica de duas amostras pareadas foi utilizado para confrontar a expressão dos marcadores no epitélio glandular *versus* estroma. O nível de significância estatístico adotado foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análise das variáveis categóricas para Musashi-1, Oct-4 e c-kit

A análise da IHQ quanto à positividade na membrana, citoplasma e/ou núcleo está representada no GRÁF. 1 para todos os três marcadores avaliados: Musashi-1, Oct-4 e c-kit.

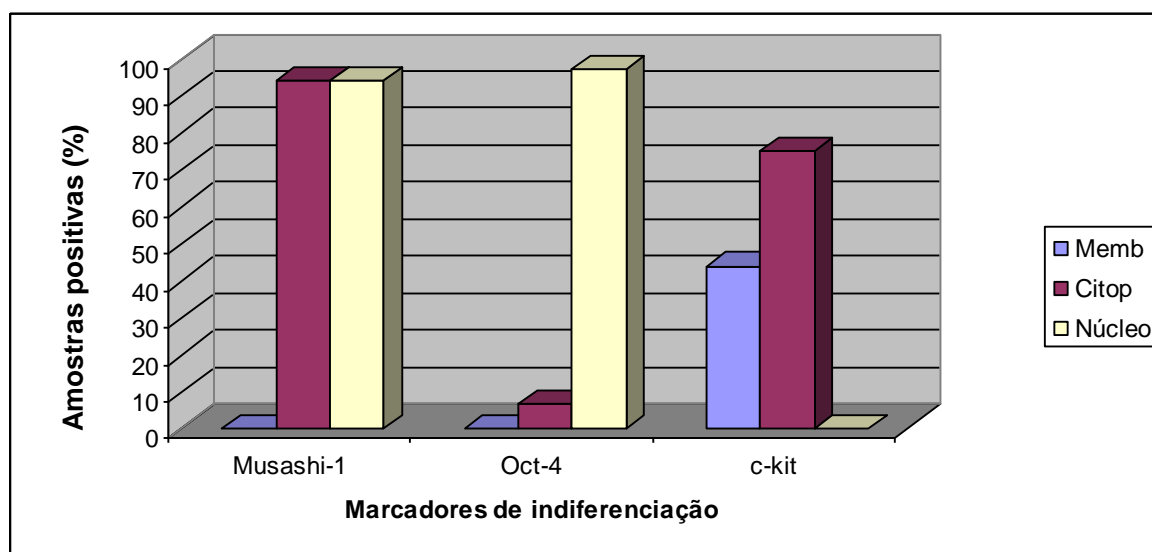


GRÁFICO 1 – Percentual de amostras que expressaram as proteínas Musashi-1, Oct-4 e c-kit nos compartimentos celulares (membrana / citoplasma / núcleo).

A proteína Musashi-1 não se expressou na membrana celular de nenhuma das amostras analisadas (0%), mas esteve expressa no citoplasma e no núcleo em igual percentual de amostras (93,7%) (FIG. 9-A). O Oct-4 não se expressou na membrana celular (0%) e teve mínima expressão citoplasmática (6,7%). O padrão predominante para o Oct-4 (96,9%) foi nuclear (FIG. 9-B). Já para a proteína c-kit, houve marcação em membrana e citoplasma, 43 e 75%, respectivamente, enquanto no núcleo não houve expressão dessa proteína (0%).

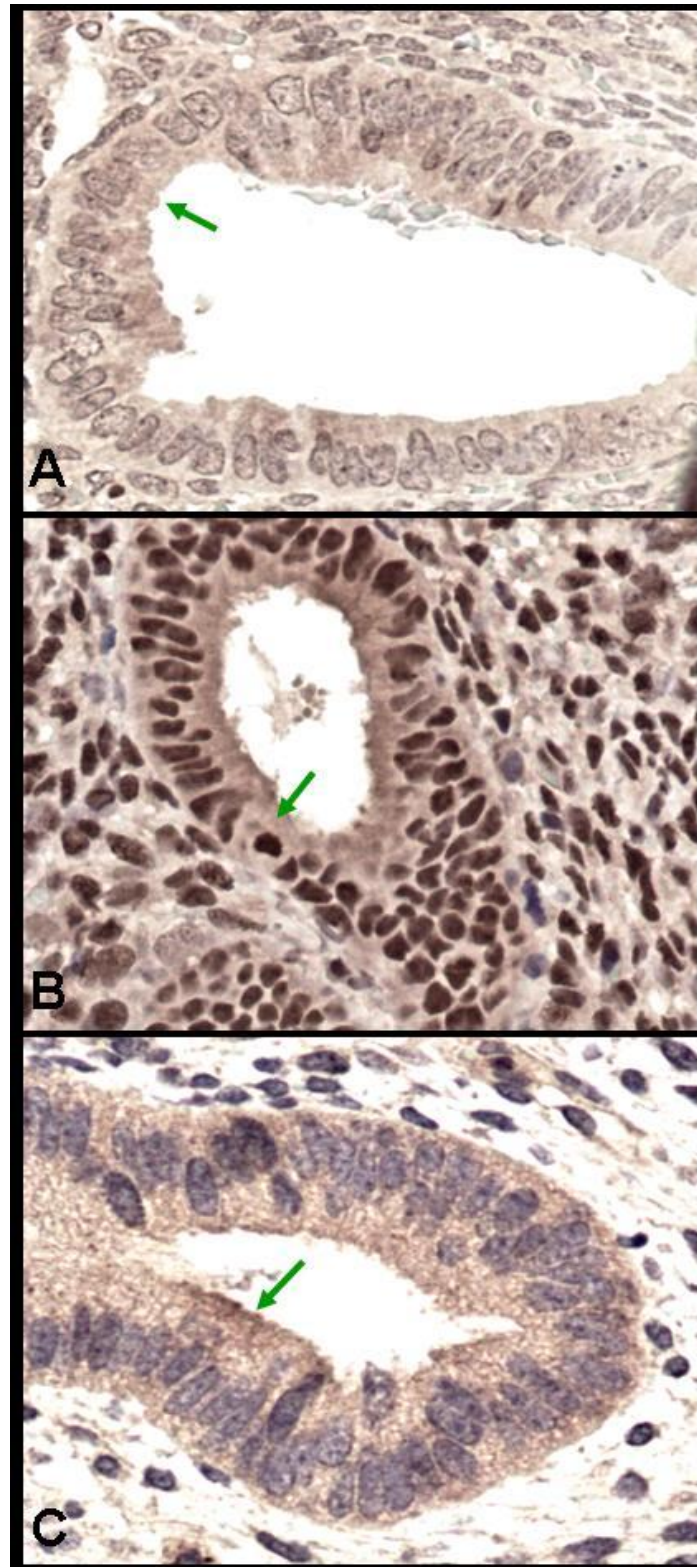


FIGURA 9 – Microscopia óptica de tecido endometrial de paciente saudável com amplificação de 200 X, demonstrando o padrão celular de marcação dos anticorpos Musashi-1, Oct-4 e c-kit.

A seta verde (→) representa no detalhe o padrão predominante de imunocoloração de cada anticorpo. (A) Expressão citoplasmática e nuclear da proteína Musashi-1. (B) Expressão predominantemente nuclear do Oct-4. (C) Expressão citoplasmática e transmembrana da proteína c-kit.

A análise qualitativa da expressão dos marcadores de indiferenciação Musashi-1, Oct-4 e c-kit em relação à localização nos compartimentos endometriais (glândula, estroma e/ou endotélio vascular) está representada no GRAF. 2. Para a proteína Musashi-1, houve alto percentual de amostras imunocoradas em glândulas e estroma (93,8%) e moderada marcação no endotélio (50%). Em relação ao marcador celular Oct-4, a expressão foi bastante alta em glândulas (93,8%), moderada no estroma (75%) e intermediária no endotélio vascular (46,2%). A proteína c-kit teve alta expressão no epitélio glandular (81,3%), intermediária no estroma (43,8%) e baixa no endotélio vascular (6,7%).

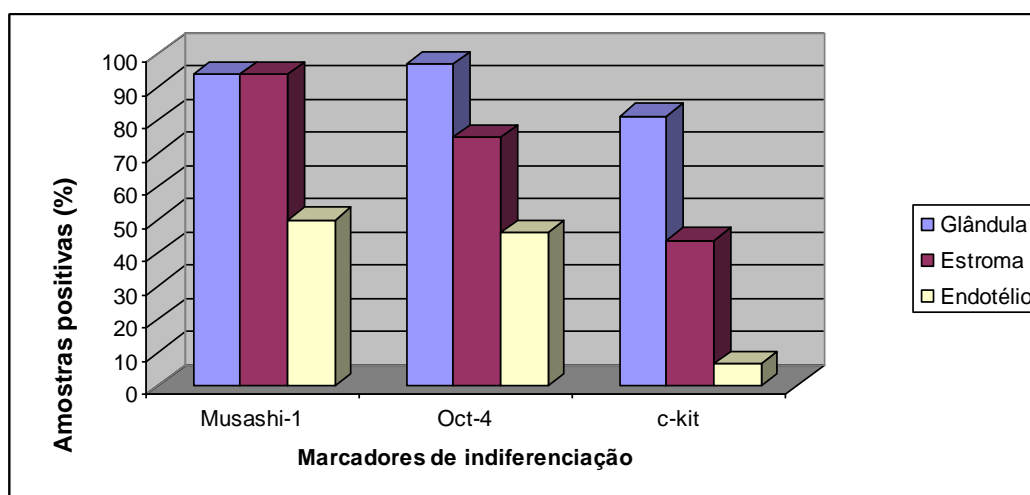


GRÁFICO 2 – Percentual de amostras que expressaram as proteínas Musashi-1, Oct-4 e c-kit nos compartimentos tissulares endometriais (epitélio glandular, estroma e endotélio vascular).

Na análise individualizada por grupos para a Musashi-1 (controle X eutópico X lesão), houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,021$) para alto percentual de amostras com marcação endotelial nos tecidos de paciente com endometriose (TAB. 1). Em relação ao Oct-4 e à proteína c-kit, a análise por grupos não identificou diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$, TAB. 1).

TABELA 1

Proporção de amostras que expressaram as proteínas Musashi-1, Oct-4 e c-kit nos compartimentos tissulares endometriais (epitélio glandular, estroma e endotélio vascular) nos três grupos estudados: controle, endométrio eutópico de paciente com endometriose e lesão endometriótica

Grupo	Controle	Eutópico	Lesão
Musashi-1			
Epitélio glandular	4/4	5/6	6/6
Estroma	4/4	5/6	6/6
Endotélio vascular*	0/4	4/5	3/5
Oct-4			
Epitélio glandular	4/4	6/6	5/6
Estroma	4/4	4/6	4/6
Endotélio vascular	3/4	2/4	1/5
c-kit			
Epitélio glandular	4/4	4/6	5/6
Estroma	1/4	3/6	3/6
Endotélio vascular	0/4	1/5	0/6

* $p < 0,05$ (Qui-quadrado com teste da razão de verossimilhança).

5.2 Análise quantitativa de imunocoloração para a proteína Musashi-1

A análise de imunocoloração em relação à intensidade, ao percentual de células coradas e ao IRS foi realizada para o tecido endometrial em conjunto, assim como de forma individualizada para estroma e glândula. A avaliação por microscopia óptica da proteína Musashi-1 está representada na FIG. 10-A. Algumas lâminas apresentaram padrão de imunomarcção com grupamentos celulares apresentando diferentes intensidades de coloração (FIG. 10-B).

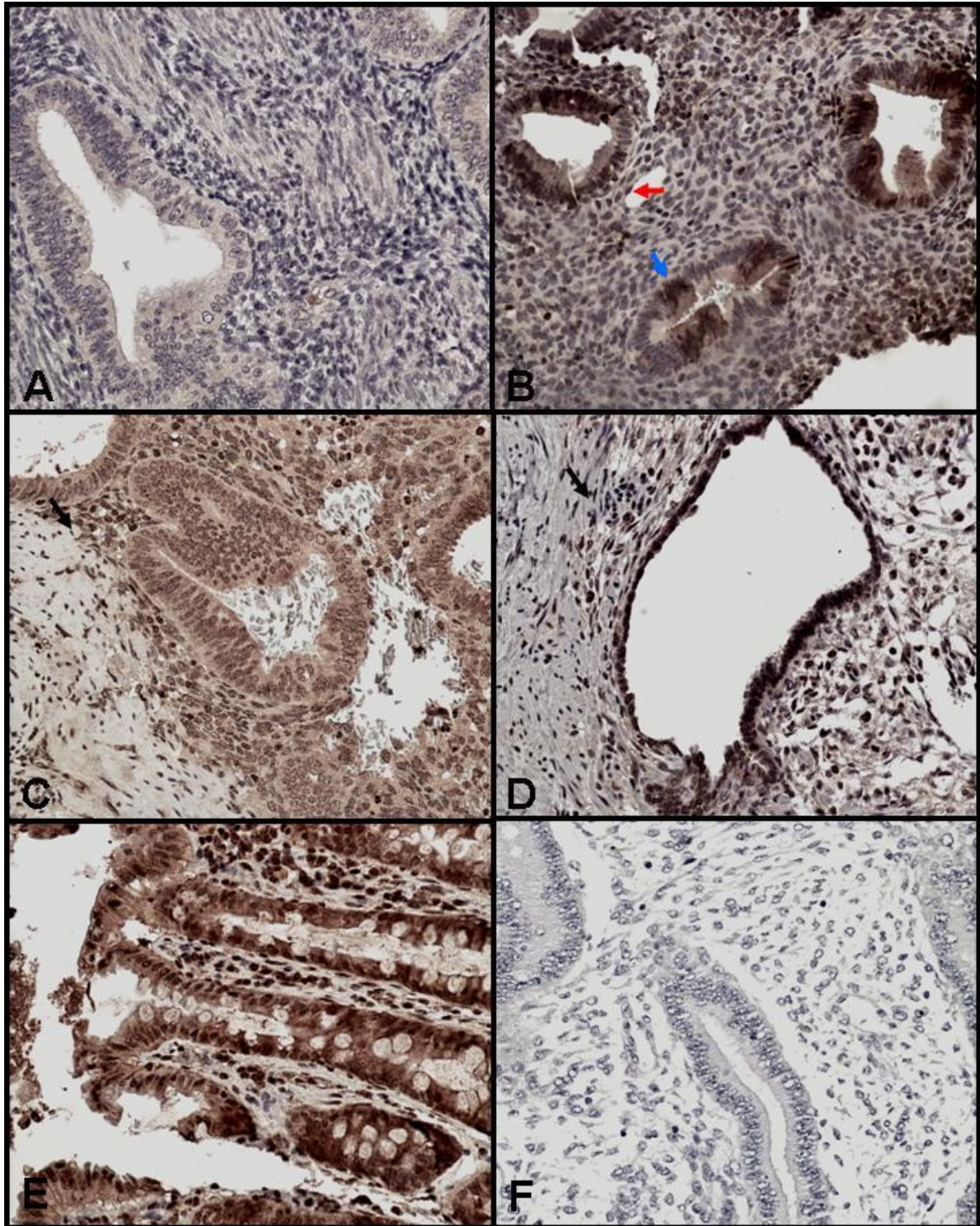


FIGURA 10 – Microscopia com aumento de 200 X para imunolocalização do marcador Musashi-1.

(A) Endométrio de paciente saudável com fraca intensidade de coloração em glândula e estroma. (B) Endométrio eutópico de paciente com endometriose com coloração moderada a intensa. A seta vermelha (→) aponta para um endotélio com células coradas e a seta azul (→) aponta para um padrão de marcação em grupamentos celulares (nichos). (C e D) Lesões endometrióticas com intensa imunocoloração. A seta preta (→) aponta para o limite de transição entre a lesão endometriótica e o tecido sadio. (E) Controle positivo. (F) Controle negativo.

Na análise global da proteína Musashi-1 para todas as amostras envolvidas no estudo, o percentual de imonocoloração foi moderado, o que representa que 50 a 81% das células endometriais foram coradas. A intensidade de marcação para a Musashi-1 foi intermediária, com mediana de 1,5 (escala 0 a 3). Como resultante, o IRS global foi indicativo de padrão de coloração intermediária e não apresentou diferença entre os compartimentos glandular e estroma (GRAF. 3).

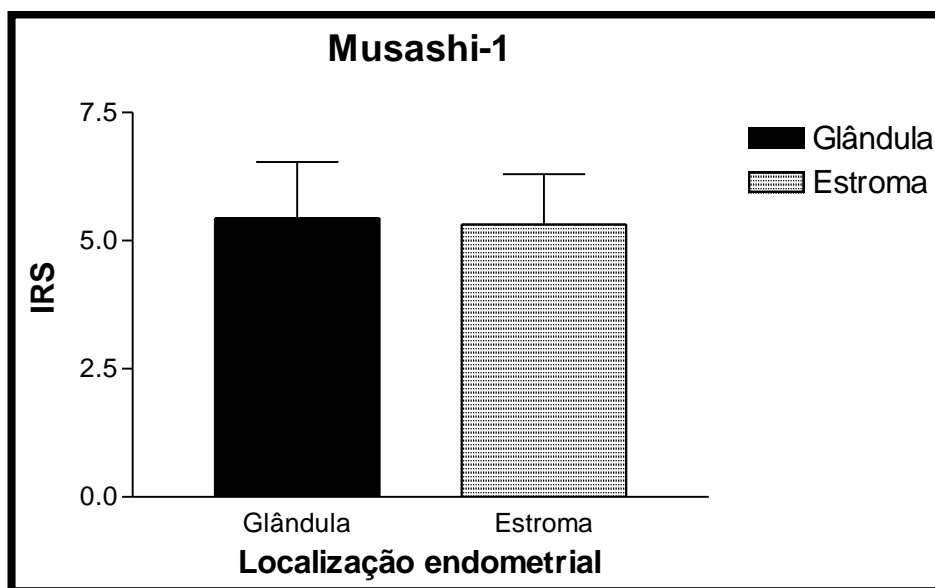


GRÁFICO 3 – Comparação entre os IRS glandular e estromal da proteína Musashi-1 de todas as amostras analisadas.

Na comparação entre grupos, o grupo lesão apresentou padrão de imunomarcção para a proteína Musashi-1 no epitélio glandular aparentemente maior que o dos grupos controle e eutópico, mas essa diferença não teve significância estatística. Também não houve diferença quando avaliados o estroma e o tecido endometrial como um todo (GRAF. 4). A avaliação do percentual e da intensidade de imunomarcção e do IRS para a Musashi-1 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, tanto na análise do tecido endometrial glandular e estromal individualizada quanto em conjunto.

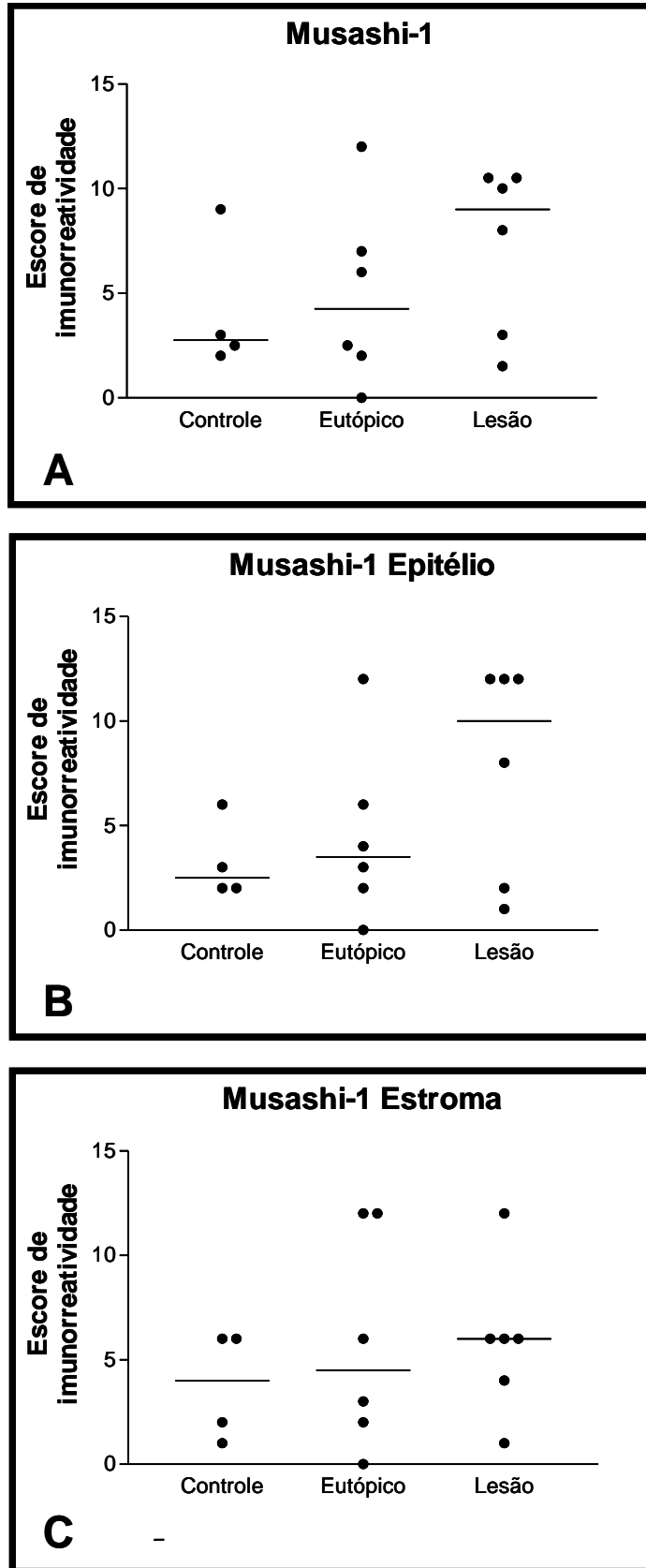


GRÁFICO 4 - IRS da proteína Musashi-1 por grupos (controle, eutópico e lesão).

(A) IRS total, (B) IRS do epitélio glandular e (C) IRS estromal.

5.3 Análise quantitativa de imunocoloração para o Oct-4

A avaliação por microscopia óptica da IHQ para o marcador Oct-4 está representada na FIG. 11.

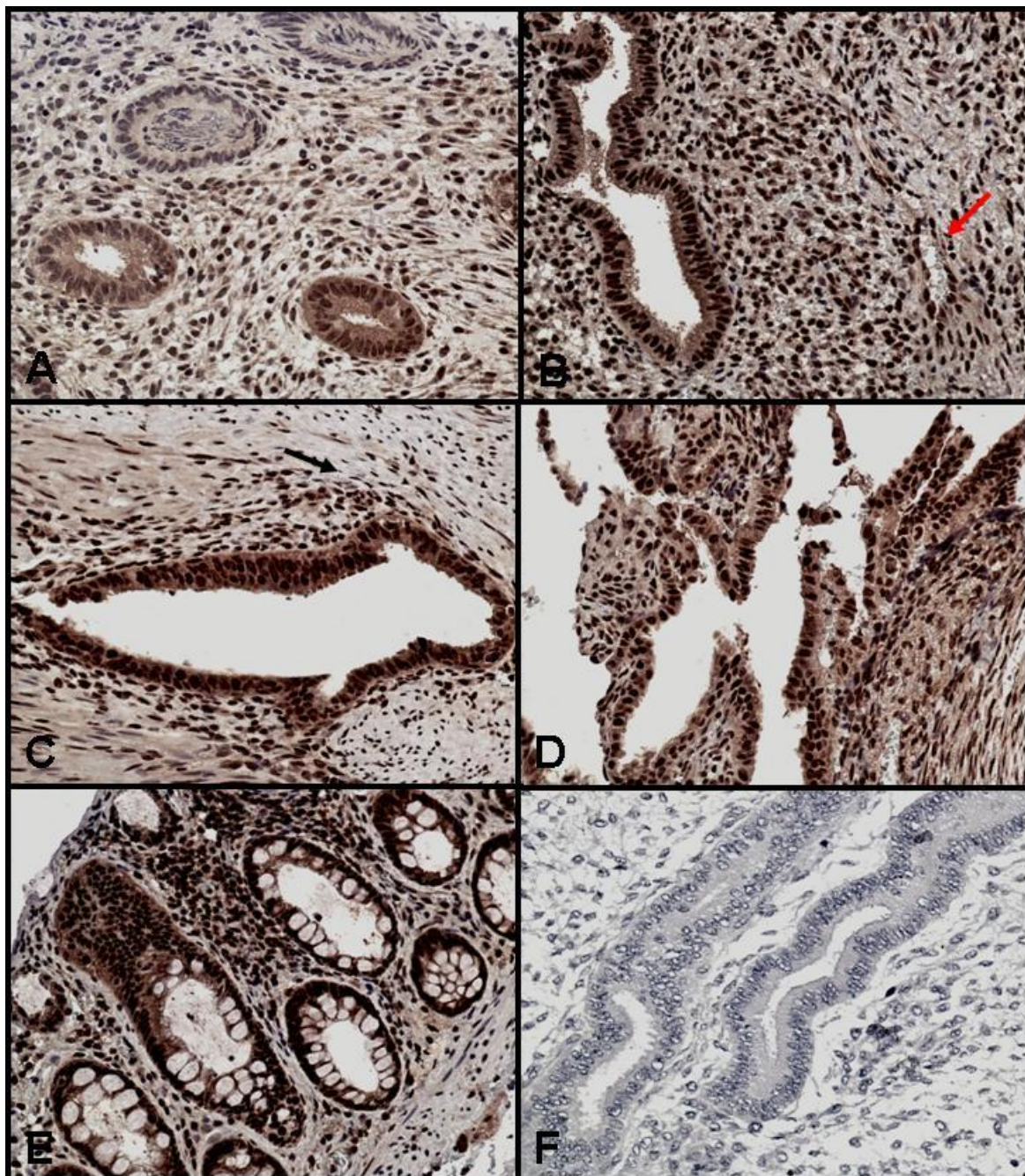


FIGURA 11 – Microscopia com aumento de 200 X para a imunolocalização do marcador Oct-4.

(A) Endométrio de paciente saudável com intensa marcação em glândula e estroma. (B) Endométrio eutópico de paciente com endometriose com coloração intensa. A seta vermelha (→) aponta para um endotélio com células coradas. (C e D) Lesões endometrióticas com intensa e moderada imunocoloração. A seta preta (→) aponta para o limite de transição entre a lesão endometriótica e o tecido sadio. (E) Controle positivo. (F) Controle negativo.

Na análise global das amostras estudadas para o Oct-4, houve elevado percentual de células coradas (mediana 3,25 – mais de 80%) e alta intensidade de marcação (mediana 2,5 – entre moderada e forte). Assim, a mediana do IRS foi consideravelmente alta para todas as análises – mediana do IRS geral 7,25. Na análise comparativa entre o IRS glandular e estromal para o Oct-4 de todas as amostras incluídas em conjunto, não se verificou diferença significativa (GRAF. 5).

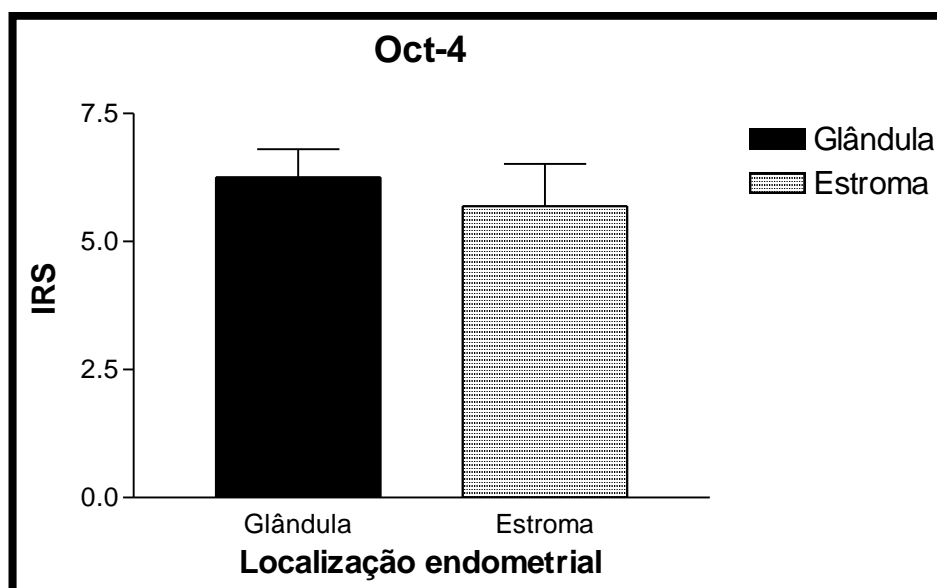


GRÁFICO 5 – Comparação entre os IRS glandular e estromal da proteína Oct-4 para o global de amostras.

Na comparação entre os grupos, a intensidade e o percentual de células coradas, assim como o IRS para o Oct-4 nos compartimentos tissulares glandular, estromal e em conjunto, não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas. Os IRS para o Oct-4 na análise individualizada e em grupos estão representados no GRAF. 6.

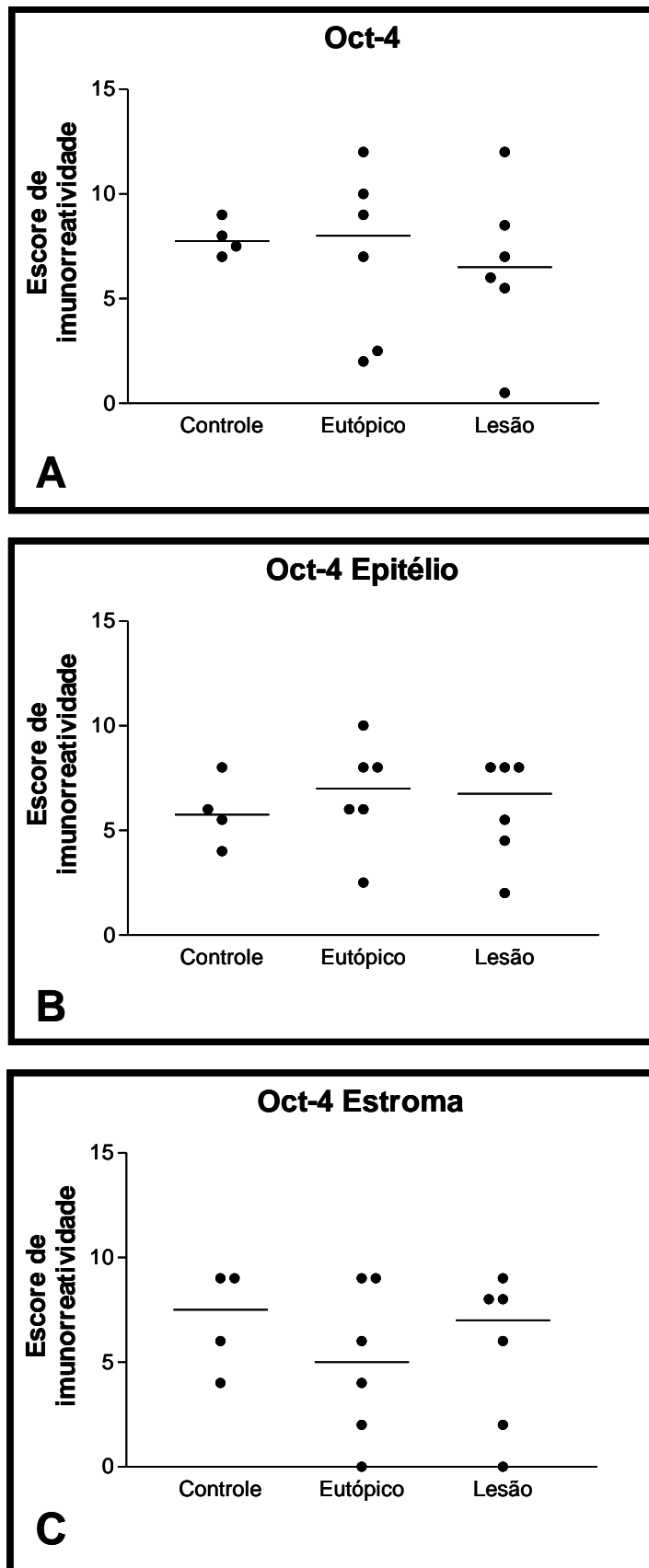


GRÁFICO 6 - IRS do Oct-4 por grupos (controle, eutópico e lesão).

(A) IRS total, (B) IRS do epitélio glandular e (C) IRS estromal.

5.4 Análise quantitativa da imunocoloração para a proteína c-kit

A IHQ para a proteína c-kit está representada na FIG. 12-A. Algumas lâminas apresentaram padrão de imunomarcção por grupamentos celulares (FIG. 12-B).

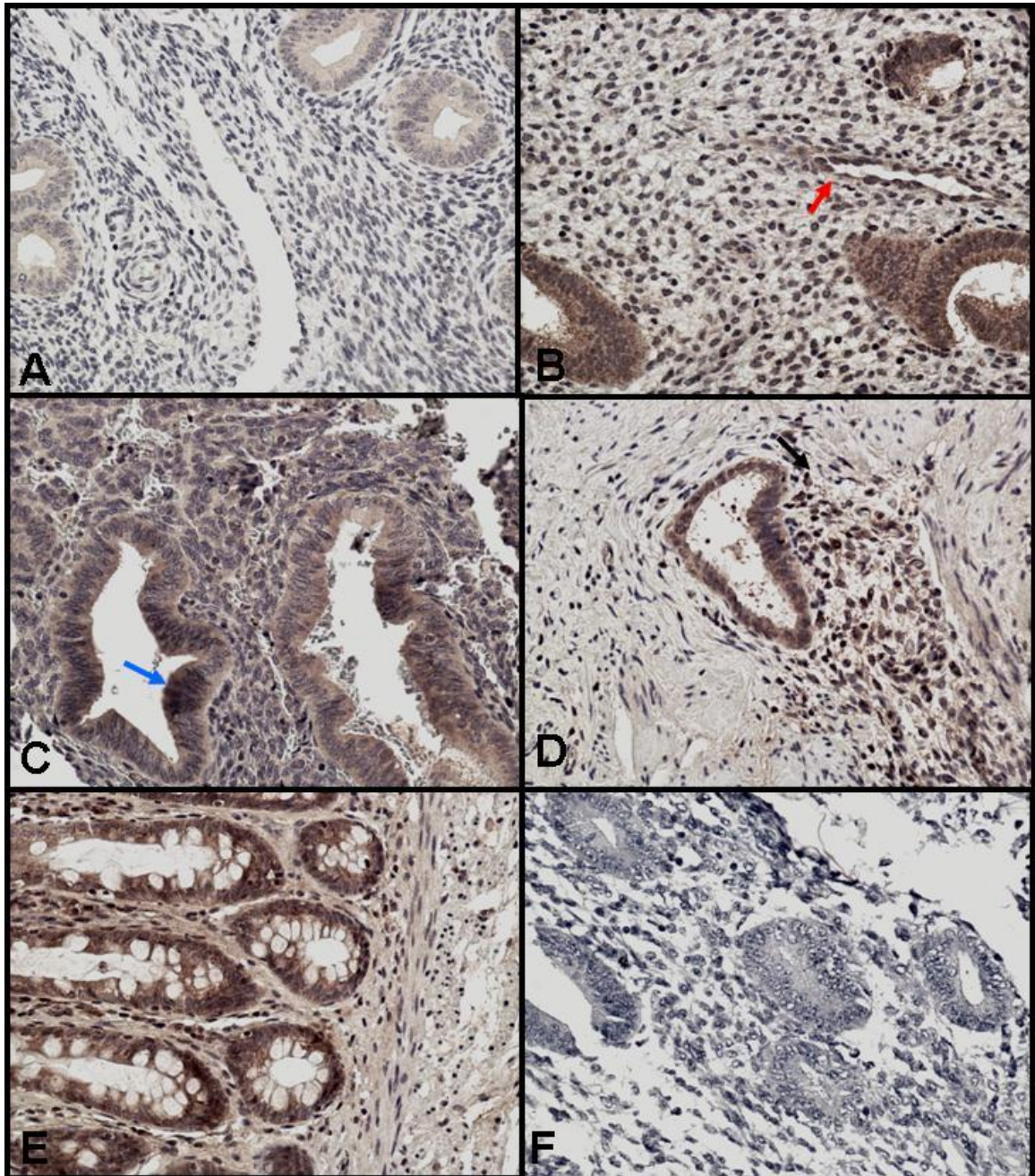


FIGURA 12 – Microscopia com aumento de 200 X para imunolocalização do marcador c-kit.

(A) Endométrio de paciente saudável com fraca intensidade de coloração em glândula e mínimo em estroma. (B) Endométrio eutópico de paciente com endometriose com coloração moderada a intensa. A seta vermelha (→) aponta para um endotélio com células coradas. (C e D) Lesões endometrióticas com intensa imunocoloração. A seta preta (→) aponta para o limite de transição entre a lesão endometriótica e o tecido sadio e a seta azul (→) aponta para um padrão de marcação em grupamentos celulares (nichos). (E) Controle positivo. (F) Controle negativo.

Em uma análise global das amostras estudadas para a proteína c-kit, houve um percentual intermediário (entre 10% e 50%) de células coradas e predomínio de marcação fraca a moderada. Assim, a mediana do IRS para c-kit foi 2,5. A avaliação comparativa entre os compartimentos endometriais glandular e estromal para a proteína c-kit a partir dos IRS demonstrou maior expressão dessa proteína no compartimento epitelial (GRAF. 7).

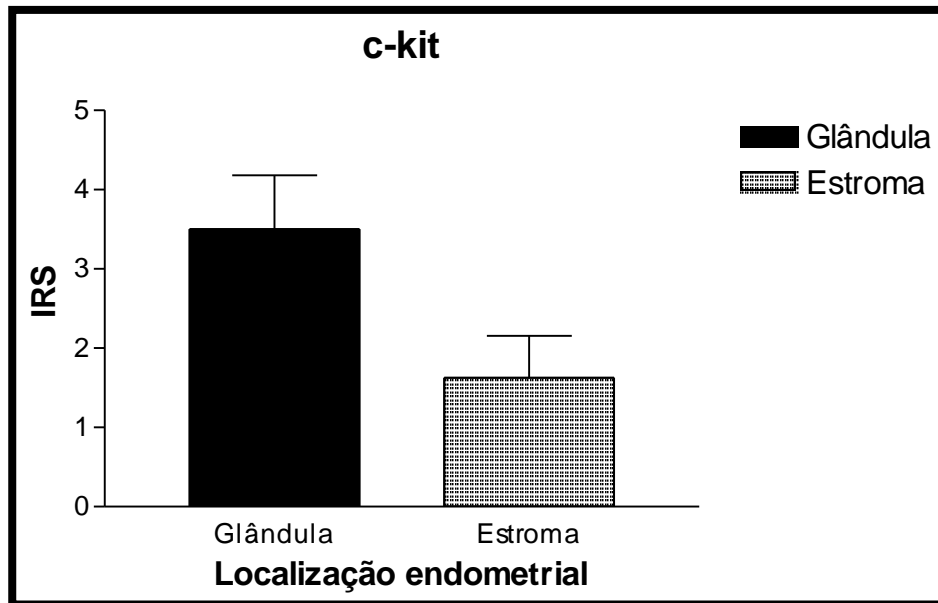


GRÁFICO 7 – Comparação entre os IRS glandular e estromal da proteína c-kit de todas as amostras analisadas.

A diferença entre o IRS glandular e estromal foi estatisticamente significativa (teste de Wilcoxon, $p < 0,05$).

Na comparação entre os grupos, o IRS para a proteína c-kit no estroma foi mais alto no endométrio eutópico que nos grupos controle e lesão ($p < 0,05$). Entretanto, no compartimento glandular e no endométrio como um todo, não se constatou diferença estatisticamente significativa. Os IRS glandular, estromal e em conjunto estão representados no GRAF. 8.

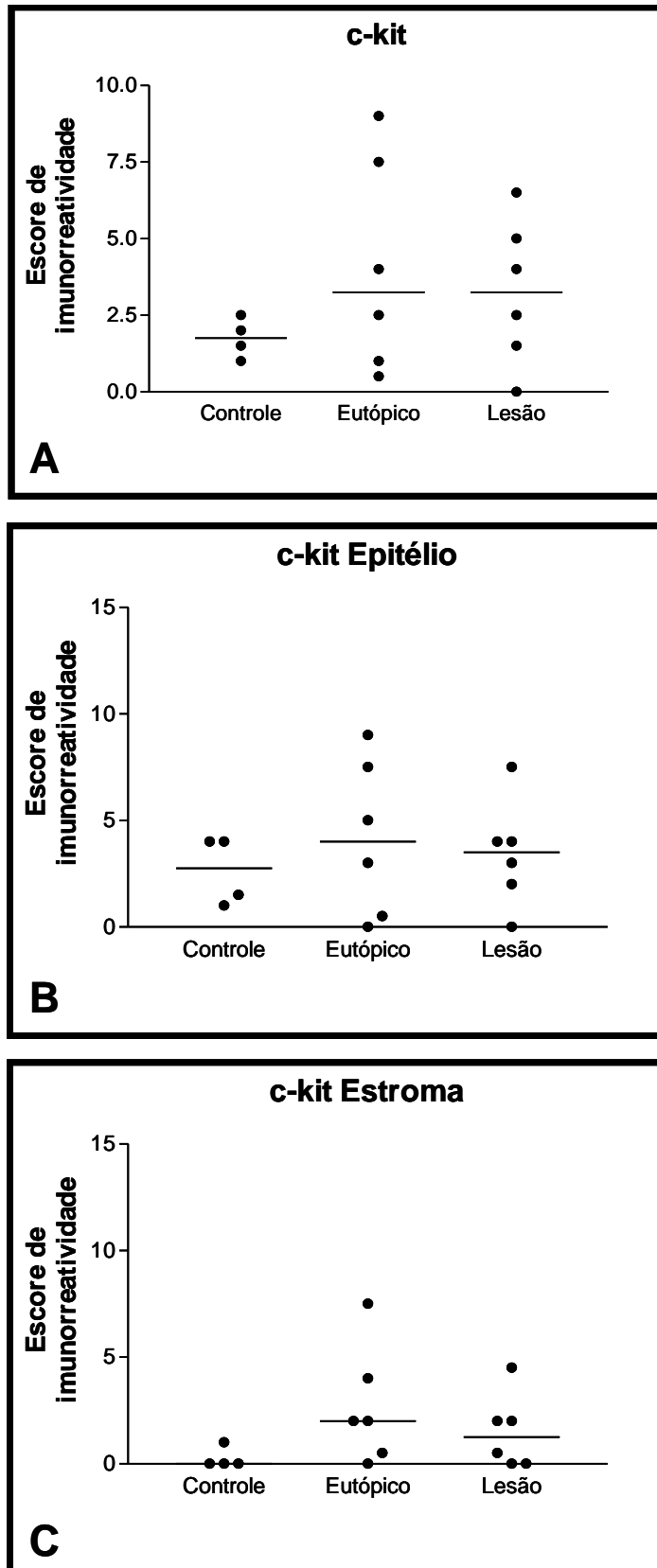


GRÁFICO 8 - IRS da proteína c-kit por grupos (controle, eutópico e lesão).

(A) IRS total, (B) IRS do epitélio glandular e (C) IRS estromal.

6 DISCUSSÃO

6.1 Expressão de Musashi-1 no endométrio

Até o momento, apenas o estudo de Götte *et al.* (2008) pesquisou a expressão de Musashi-1 em células endometriais: endométrio saudável, implantes endometriais ectópicos e carcinoma endometrial. Nesse estudo, a proteína Musashi-1 apresentou padrão de expressão celular citoplasmático e nuclear, assim como evidenciado no presente trabalho. A localização celular encontrada para a proteína Musashi-1 justifica seu perfil conhecido de proteína citoplasmática ligada ao RNA.

Em relação à expressão de Musashi-1 nos compartimentos tissulares endometriais (glandular, estromal e endotelial), esse marcador esteve presente em todos eles. A maior positividade no endotélio do grupo de lesões endometrióticas em relação aos outros grupos (controle e eutópico) poderia sugerir possível correlação entre CTPs e o processo de neoangiogênese, que é frequente nos implantes endometrióticos. Götte *et al.* (2008) não avaliaram o compartimento vascular, mas a expressão de Musashi no estroma de lesões endometrióticas foi significativamente maior (cinco vezes) quando comparado ao endométrio normal.

Outra característica interessante encontrada neste estudo em relação ao padrão de distribuição de células coradas para a proteína Musashi-1 foi mais intensidade de coloração por grupamentos. Na pesquisa de Götte *et al.*, 2008 também foram identificados vários padrões de imunomarcção, células isoladas e em grupos, tanto no epitélio glandular quanto no estroma endometrial. Esses grupamentos celulares com mais intensidade de marcação poderiam corresponder a nichos de CTPs.

Em relação à avaliação global de todas as amostras de tecido endometrial para a proteína Musashi-1, o percentual e a intensidade de imunomarcção foram muito elevados para uma proteína candidata a marcador de CTPs endometriais. A expressão esperada seria bem menor que a encontrada, considerando os resultados obtidos por outros ensaios para CTPs, como por exemplo a clonogenicidade (CHAN; SCHWAB; GARGETT, 2004).

6.2 Expressão de Oct-4 no endométrio

O padrão celular de expressão do Oct-4 foi predominantemente nuclear (96,7%), correspondendo à sua função de fator de transcrição. O Oct-4 expressou-se em todos os compartimentos tissulares endometriais e na maioria das amostras esteve expresso em glândulas e estroma, 93,5 e 75%, respectivamente, e em quase metade das amostras foi visto no endotélio vascular (46,1%). A presente investigação não identificou diferença estatisticamente significativa na expressão de Oct-4 nos compartimentos endometriais entre os grupos estudados.

Em relação ao global de amostras, tanto o percentual (> 80%) e a intensidade (entre moderada e forte) de imunomarcacão para o Oct-4 quanto o IRS (7,25) foram muito acima do esperado para um conhecido marcador de CTPs. A comparacão da expressão do Oct-4 no global ou por grupos nos compartimentos tissulares endometriais não detectou diferencas.

Em relacão aos dados da literatura acerca do Oct-4 em tecidos endometriais, estudo preliminar de Matthai *et al.* (2006) demonstrou que o RNA mensageiro do Oct-4 está presente em 100% das amostras de endométrio, mas na IHQ o padrão de expressão foi variável. Sbracia *et al.* (2007) compararam a expressão do fator de transcriçã Oct-4 no endométrio eutópico e lesões endometrióticas em estágio grave. Houve expressão do Oct-4 em cerca de 40% das células epiteliais de lesões ovarianas e peritoneais contra menos de 1% no endométrio eutópico de pacientes com e sem endometriose. Recentemente, Bentz *et al.* (2010) investigaram o marcador Oct-4 por PCR e IHQ nas fases do ciclo menstrual, proliferativa e secretora, em extensa série de pacientes (n=89). A pesquisa de Oct-4 por PCR evidenciou positividade em 71% das amostras na fase folicular e 68% das amostras na fase lútea. Já à IHQ as amostras positivas foram 67% na fase folicular e 58% na fase lútea. Nenhuma diferencã estatisticamente significativa foi constatada entre as fases folicular e lútea, sugerindo que a expressão do Oct-4 não está envolvida ou é modulada por mudançãs hormonais induzidas pelo ciclo menstrual (BENTZ *et al.*, 2010).

6.3 Expressão de c-kit no endométrio

Na análise do padrão de expressão celular da proteína c-kit a localização celular foi transmembrana e citoplasmática, não sendo a mesma identificada no núcleo. Esses resultados se justificam pela função conhecida da c-kit de receptor transmembrana tirosina-cinase.

A expressão da proteína c-kit por compartimentos tissulares endometriais foi predominantemente glandular, mas também foi encontrada no estroma e, raramente, no endotélio vascular. A expressão desse marcador por grupos (controle *versus* eutópico *versus* lesão) em relação aos compartimentos endometriais foi similar. Algumas amostras, assim como para a proteína Musashi-1, apresentaram padrão de expressão por grupamentos (nichos). A expressão da proteína c-kit no estroma endometrial foi maior no endométrio eutópico de pacientes portadoras de endometriose que no endométrio saudável e na lesão endometriótica. Isso poderia reforçar a hipótese de que células endometriais indiferenciadas refluidas durante o período menstrual, em mulheres com alto percentual de CTPs endometriais, poderia ser a origem para lesões endometrióticas.

Dados disponíveis na literatura em relação à c-kit e ao tecido endometrial são bastante conflitantes. O primeiro estudo publicado acerca da expressão da proteína c-kit no endométrio normal falhou em demonstrar a sua presença tanto em glândulas quanto no estroma (LAMMIE *et al.*, 1994). Já Elmore *et al.* (2001) identificaram imunopositividade para a c-kit em 93% das amostras de endométrio glandular normal em fase proliferativa e em 79% dos exemplares em fase secretora, com expressão citoplasmática e transmembrana. Posteriormente, Cho *et al.* (2004) avaliaram a expressão de c-kit no endométrio da mulheres em diferentes períodos de vida, desde fetal até a atrofia senil. Eles realçaram que essa proteína está fracamente expressa no estroma e nas glândulas basais do endométrio humano nas várias fases de vida (CHO *et al.*, 2004).

Na endometriose, a proteína c-kit foi avaliada por Osuga *et al.* (2000). Eles dosaram as concentrações de FCT por PCR no fluido peritoneal coletado por videolaparoscopia de pacientes com e sem endometriose e ressaltaram que nas pacientes com endometriose a concentração de FCT é significativamente maior. Essas foram evidências preliminares lançadas sobre o possível envolvimento de CTPs na patogênese da endometriose.

Sabe-se que a superexpressão da proteína c-kit associa-se à ativação ou inativação de mutações dominantes que podem estar relacionadas ao comportamento agressivo de

doenças benignas e malignas, assim como poderia ocorrer na endometriose. Com isso, Uzan *et al.* compararam a expressão de c-kit no endométrio eutópico de pacientes com e sem endometriose, com lesões endometrióticas peritoneais, ovarianas e colorretais. Os autores apuraram que essa proteína está mais expressa em células glandulares endometriais eutópicas de pacientes com endometriose que no endométrio saudável. A expressão foi significativamente maior na endometriose colorretal comparada à doença ovariana e peritoneal. Nenhuma expressão de c-kit foi detectada em células endometriais estromais, tanto eutópicas quanto ectópicas. As conclusões desse grupo revelaram que a maior expressão de c-kit na endometriose profunda sinaliza o envolvimento de CTPs na patogênese da endometriose e que isso poderia ter implicações terapêuticas como a utilização de drogas com ação por inibição competitiva em receptores tirosina-cinase (UZAN *et al.*, 2005). Em 2007, Sbracia *et al.* também referiram expressão maior de c-kit (cerca de 40%) em células epiteliais de lesões endometrióticas ovarianas e peritoneais que no endométrio eutópico de pacientes com e sem endometriose (<1%).

6.4 Considerações finais

Os três marcadores avaliados apresentaram padrão de expressão celular concordante com suas funções moleculares e localizações já descritas na literatura: Musashi-1 – citoplasmático e nuclear; Oct-4 – nuclear; c-kit – transmembrana e citoplasmático.

A Musashi-1, o Oct-4 e a c-kit foram encontrados em todos os compartimentos tissulares endometriais avaliados (epitélio glandular, estroma e endotélio). A proporção de imunocoloração entre epitélio glandular e estroma endometrial foi similar para a Musashi-1 e o Oct-4, mas para a proteína c-kit a marcação foi predominantemente epitelial. Houve percentual mais alto de amostras que apresentaram marcação no endotélio para Musashi-1 de implantes endometrióticos que nas amostras de endométrio eutópico de pacientes com e sem endometriose. No estroma de tecido endometrial eutópico de pacientes com endometriose, a proteína c-kit esteve mais expressa que no endométrio saudável ou em implantes ectópicos. Todavia, o número de amostras incluídas no presente estudo foi relativamente reduzido, o que limitou o poder estatístico das comparações entre grupos. Portanto, é possível que a reprodução do mesmo estudo com maior série de pacientes possa revelar outras diferenças não identificadas.

Para todas as moléculas avaliadas, o percentual e a intensidade de imunocoloração foram muito acima do esperado para moléculas consideradas marcadores de células indiferenciadas, mas esses resultados são respaldados pela literatura conflitante. Isso ressalta que a Musashi-1, o Oct-4 e a c-kit são moléculas pouco específicas para a identificação de CTPs e, possivelmente, estão expressas em células que não são da linhagem de CTPs. Com isso, no futuro, novas moléculas com mais especificidade para células indiferenciadas e com validação por outros ensaios necessitam ser identificadas.

7 CONCLUSÕES

- Os padrões celulares dos marcadores avaliados foram os seguintes: para a proteína Musashi-1 citoplasmático e nuclear, para o Oct-4 predominantemente nuclear e para a proteína c-kit citoplasmático e transmembrana. Em algumas amostras analisadas para a proteína Musashi-1 e c-kit, houve padrão de distribuição por grupamentos celulares no epitélio glandular e estromal, que podem corresponder a nichos de supostas CTPs endometriais tanto em tecidos eutópicos e quanto ectópicos.
- Elevado percentual de células apresentou imunomarcação para Musashi-1, Oct-4 e c-kit em todos os compartimentos tissulares endometriais avaliados. Muitas dessas células imunocoradas podem corresponder às CTPs endometriais, mas é possível que esses anticorpos não sejam suficientemente específicos e podem ter identificado muitas células com algum grau de diferenciação.
- A intensidade e o percentual de imunomarcação para os marcadores Musashi-1, Oct-4 e c-kit apresentou poucas diferenças na análise por grupos: para a Musashi-1, alto percentual de amostras com imunomarcação endotelial em pacientes com endometriose e para c-kit alta imunorreatividade no endométrio eutópico de pacientes doentes.
- Os resultados do presente estudo confirmam possível envolvimento de supostas CTPs endometriais na fisiopatologia da endometriose, uma vez que as células coradas com os marcadores de indiferenciação estiveram presentes em igual ou mais alto percentual nos tecidos de paciente com endometriose. A maior marcação para a proteína Musashi-1 no compartimento endotelial vascular dos implantes endometrióticos pode estar relacionado ao processo de neoangiogênese da endometriose, assim como o alto percentual de expressão de c-kit no endométrio eutópico de pacientes doentes pode reforçar a participação de CTPs refluidas na origem dos implantes endometriais ectópicos.

REFERÊNCIAS

- BENTZ, E.K. *et al.* OCT-4 expression in follicular and luteal phase endometrium: a pilot study. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 8, n. 1, p. 38, Apr. 22, 2010.
- BULUN, S.E. Endometriosis. **N Engl J Med**, v. 360, n. 3, p. 268-79, Jan. 15, 2009.
- CERVELLÓ, I. *et al.* Identification, characterization and co-localization of label-retaining cell population in mouse endometrium with typical undifferentiated markers. **Hum Reprod**, v. 22, n. 1, p. 45-51, 2007.
- CERVELLÓ, I.; SIMÓN, C. Somatic stem cells in the endometrium. **Reprod Sci**, v. 16, n. 2, p. 200-205, 2009.
- CHAN, R.W.; GARGETT, C.E. Identification of label-retaining cells in mouse endometrium. **Stem Cells**, v. 24, n. 6, p. 1529-1538, 2006.
- CHAN, R.W.; SCHWAB, K.E.; GARGETT, C.E. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. **Biol Reprod**, v. 70, n. 6, p. 1738-1750, 2004.
- CHO, N.H. *et al.* Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. **Fertil Steril**, v. 81, n. 2, p.403-407, 2004.
- CHRISTODOULAKOS, G. *et al.* Pathogenesis of endometriosis: the role of defective immunosurveillance. **Eur J Contracept Reprod Health Care**, v. 12, n. 3, p. 194-202, 2007.
- COBELLIS L. *et al.* The pattern of expression of Notch protein members in normal and pathological endometrium. **J Anat**, v. 213, n. 4, p. 464-72, Oct. 2008.
- CRAMER, D.W. *et al.* The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise. **JAMA**, v. 255, n. 14, p. 1904-8, Apr. 11, 1986.
- DAKO EDUCATION GUIDE. **Immunohistochemical Staining Methods**. 2006. 4. ed., Disponível em: pri.dako.com/08002_25may06_ihc_guide_book.pdf. Acesso em julho de 2010.
- DARROW, S.L. *et al.* Menstrual cycle characteristics and the risk of endometriosis. **Epidemiology**, v. 4, n. 2, p. 135-42, Mar. 1993.
- DEB, K.D. *et al.* Embryonic stem cells: from markers to market. **Rejuvenation Res**, v. 11, n. 1, p. 19-37, Feb. 2008.
- DIAS JR., J.A. *et al.* Endometriose: a importância da classificação histológica. Cap. 4. In: ABRÃO, M.S. **Atlas de cirurgia ginecológica**. São Paulo: Planmark, 2006.
- DU, H. ; TAYLOR, H.S. Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. **Stem Cells**, v. 25, n. 8, p. 2082-2086, 2007.

DU, H. ; TAYLOR, H.S. Stem cells and female reproduction. **Reprod Sci**, v. 16, n. 2, p. 126-139, 2009.

ELMORE, L.W. *et al.* Expression of c-kit (CD117) in benign and malignant human endometrial epithelium. **Arch Pathol Lab Med**, v. 125, n. 1, p. 146-51, Jan 2001.

FORTE, A. *et al.* Expression pattern of stemness-related genes in human endometrial and endometriotic tissues. **Mol Med**, v. 15, n. 11-12, p. 392-401, 2009.

FRASER, I.S. Recognising, understanding and managing endometriosis. **J Hum Reprod Sci**, v. 1, n. 2, p. 56-64, Jul. 2008.

GARGETT, C.E.; MASUDA, H. Adult stem cells in the endometrium. **Mol Hum Reprod**, Jul. 13, 2010.

GARGETT, C.E. Stem cells in gynaecology. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v. 44, n. 5, p. 380-386, 2004.

GARGETT, C.E. Uterine stem cells: what is the evidence? **Hum Reprod Update**, v. 13, n. 1, p. 87-101, 2007.

GAZVANI, R.; TEMPLETON, A. New considerations for the pathogenesis of endometriosis. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 76, n. 2, p. 117-26, Feb. 2002.

GOODELL, M.A. *et al.* Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. **J Exp Med**, v. 183, n. 4, p. 1797-806, 1996.

GÖTTE, M. *et al.* Increased expression of the adult stem cell marker Musashi-1 in endometriosis and endometrial carcinoma. **J Pathol**, v. 215, n. 3, p. 317-29, 2008.

GRITTI, A.; VESCOVI, A.L.; GALLI, R. Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential. **J Physiol Paris**, v. 96, n. 1-2, p. 81-90, Jan.-Mar., 2002.

GRUENWALD, P. Origin of endometriosis from the mesenchyme of the coelomic walls. **Am J Obstet Gynecol**, v. 44, p. 470-4, 1942.

GRÜMMER, R. Animal models in endometriosis research. **Hum Reprod Update**, v. 12, n. 5, p. 641-9, Sep-Oct., 2006.

GRUPPO ITALIANO PER LO STUDIO DELL'ENDOMETRIOSI. Prevalence and anatomical distribution of endometriosis in women with selected gynaecological conditions: results from a multicentric Italian study. **Hum Reprod**, v. 9, n. 6, p. 1158-62, Jun. 1994.

HALME, J. *et al.* Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. **Obstet Gynecol**, v. 64, n. 2, p. 151-4, Aug. 1984.

HIRSCHMANN-JAX, C. *et al.* A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 28, 101, n. 39, p. 14228-33, 2004.

- HONORÉ, G.M. Extrapelvic endometriosis. **Clin Obstet Gynecol**, v. 42, n. 3, p. 699-711, Sep. 1999.
- HOUSTON, D.E. *et al.* The epidemiology of pelvic endometriosis. **Clin Obstet Gynecol**, v. 31, n. 4, p. 787-800, Dec. 1988.
- HOUSTON, D.E. Evidence for the risk of pelvic endometriosis by age, race and socioeconomic status. **Epidemiol Rev**, v. 6, p. 167-91, 1984.
- IKEGAMI, Y. *et al.* Serum-independent cardiomyogenic transdifferentiation in human endometrium-derived mesenchymal cells. **Artif Organs**, v. 34, n. 4, p. 280-8, Apr. 2010.
- JENSEN, J.R. *et al.* A potential role for colony-stimulating factor 1 in the genesis of the early endometriotic lesion. **Fertil Steril**, v. 93, n. 1, p. 251-6, Jan. 2010.
- JOSEPH, N.M.; MORRISON, S.J. Toward an understanding of the physiological function of Mammalian stem cells. **Dev Cell**, v. 9, n. 2, p. 173-83, Aug. 2005.
- KATO, K. *et al.* Characterization of side-population cells in human normal endometrium. **Hum Reprod**, v. 22, n. 5, p.1214-23, 2007.
- KIM, J.Y.; TAVARÉ, S.; SHIBATA, D. Counting human somatic cell replications: methylation mirrors endometrial stem cell divisions. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, n. 49, p. 17739-44, Dec. 6, 2005.
- LAMMIE, A. *et al.* Expression of c-kit and kit ligand proteins in normal human tissues. **J Histochem Cytochem**, v. 42, n. 11, p. 1417-1425, Nov. 1994.
- LEYENDECKER, G.; WILDT, L.; MALL, G. The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. **Arch Gynecol Obstet**, v. 280, n. 4, p. 529-38, Oct. 2009.
- LI, L.; CLEVERS, H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. **Science**, v. 327, n. 5965, p. 542-5, Jan. 29, 2002.
- LYMAN, S.D.; JACOBSEN, S.E. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. **Blood**, v. 91, n. 4, p. 1101-34, Feb. 15, 1998.
- MARTIN JR., J.D.; HAUCK, A.E. Endometriosis in the male. **Am Surg**, v. 51, n. 7, p. 426-30, Jul. 1985.
- MARUYAMA, T. *et al.* Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology. **Reproduction**, v. 140, n. 1, p. 11-22, Jul. 2010.
- MARUYAMA, T. Stem/progenitor cells and the renegeation potentials in the human uterus. **Reprod Med Biol**, v. 9, p. 9-16, 2010.
- MASUDA, H. *et al.* Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/gamma c(null) immunodeficient mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, n. 6, p. 1925-30, Feb., 6, 2007.

MASUDA, H. *et al.* Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10387, Apr., 28, 2010.

MATSUURA, K. *et al.* Coelomic metaplasia theory of endometriosis: evidence from in vivo studies and an in vitro experimental model. **Gynecol Obstet Invest**, v. 47 Suppl 1, p. 18-20; discussion 20-2, 1999.

MATTHAI, C. *et al.* Oct-4 expression in human endometrium. **Mol Hum Reprod**, v. 12, n. 1, p. 7-10, Jan. 2006.

MIMEAULT, M.; BATRA, S.K. Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. **Stem Cell Rev**, v. 4, n. 1, p. 27, Spring, 2008.

MINTS, M. *et al.* Endometrial endothelial cells are derived from donor stem cells in a bone marrow transplant recipient. **Hum Reprod**, v. 23, n. 1, p. 139-43, Jan. 2008.

MISSMER, S.A.; CRAMER, D.W. The epidemiology of endometriosis. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 1-19, vii, Mar. 2003.

MORSCH, D.M. *et al.* c-fos gene and protein expression in pelvic endometriosis: a local marker of estrogen action. **J Mol Histol**, v. 40, n. 1, p. 53-8, Feb. 2009.

NEME, R.M. *et al.* Epidemiological study on risk factors of pelvic endometriosis in Brazil. **Fertil Steril**, v. 77, n. 2, p. Supl.1, p. S37, 2002.

OKANO H. *et al.* Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells. **Exp Cell Res**, v. 306, n. 2, p. 349-56, Jun. 2005.

OSUGA, Y. *et al.* Stem cell factor (SCF) concentrations in peritoneal fluid of women with or without endometriosis. **Am J Reprod Immunol**, v. 44, n. 4, p. 231-5, Oct. 2000.

PADYKULA, H.A. Regeneration in the primate uterus: the role of stem cells. **Ann NY Acad Sci**, v. 622, p. 47-56, 1991.

PESCE, M.; SCHÖLER, H.R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. **Stem Cells**, v. 19, n. 4, p. 271-8, 2001.

PINKERT, T.C.; CATLOW, C.E.; STRAUS, R. Endometriosis of the urinary bladder in a man with prostatic carcinoma. **Cancer**, v. 43, n. 4, p. 1562-7, Apr. 1979.

RAMOS-VARA, J.A.; MILLER, M.A. Comparison of two polymer-based immunohistochemical detection systems: envision+ and impress. **J Microsc**, v. 224, n. Pt 2, p. 135-9, Nov. 2006.

RAMOS-VARA, J.A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Vet Pathol**, v. 42, p. 405-426, 2005.

REMMELE, W.; STEGNER, H.E. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. **Pathologe**, v. 8, n. 3, p. 138-40, May, 1987.

RO, S.; RANNALA, B. Methylation patterns and mathematical models reveal dynamics of stem cell turnover in the human colon. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 19, p. 10519-21, Sep. 11, 2001.

SAMPSON, J.A. Heterotopic or misplaced endometrial tissue. **Am J Obstet Gynecol**, v. 10, p. 649-664, 1925.

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.

SAMPSON, J.A. Ovarian hematomas of endometrial type (perforating hemorrhagic cysts of the ovary) and implantation adenomas of endometrial type. **Boston Med Surg J**, v. 186, p. 445, 1922.

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.

SBRACIA, M. *et al.* Arduini Stem cell antigens in ectopic epithelial cells of endometriotic lesions: is endometriosis a disease originated from stem cells? **Fertil Steril**, v. 88, Suppl. 1, p. S61, Sep. 2007.

SCHWAB, K.E.; CHAN, R.W.; GARGETT, C.E. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. **Fertil Steril**, v. 84, Suppl. 2, p. 1124-30, Oct. 2005.

SCHWAB, K.E.; GARGETT, C.E. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. **Hum Reprod**, v. 22, n. 11, p. 2903-11, Nov. 2007.

SIGNORELLO, L.B. *et al.* Epidemiologic determinants of endometriosis: a hospital-based case-control study. **Ann Epidemiol**, v. 7, n. 4, p. 267-741, May. 1997.

SIMPSON, J.L. *et al.* Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. **Am J Obstet Gynecol**, v. 137, n. 3, p. 327-31, Jun. 1, 1980.

SOGO, S. *et al.* Induction of c-kit molecules on human CD34+/c-kit < low cells: evidence for CD34+/c-kit < low cells as primitive hematopoietic stem cells. **Stem Cells**, v. 15, n. 6, p. 420-9, 1997.

SOUZA, V.F. *et al.* Células-tronco: uma breve revisão. **Rev Ciên Méd Biol**, v. 2, p. 251-56, 2003.

TAYLOR, H.S. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. **JAMA**, v. 292, n. 1, p. 81-5, Jul. 2004.

TEMPFER, C.B. *et al.* Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: part II--endometriosis. **Hum Reprod Update**, v. 15, n. 1, p. 97-118, Jan.-Feb., 2009.

TRELOAR, S.A. *et al.* Genetic influences on endometriosis in an Australian twin sample. **Fertil Steril**, v. 71, n. 4, p. 701-10, Apr. 2009.

UZAN, C. *et al.* Endometrium from women with and without endometriosis, and peritoneal, ovarian and bowel endometriosis, show different c-kit protein expression. **J Reprod Immunol**, v. 65, n. 1, p. 55-63, Feb. 2005.

VAN OS, R.; KAMMINGA, L.M.; DE HAAN, G. Stem cell assays: something old, something new, something borrowed. **Stem Cells**, v. 22, n. 7, p. 1181-90, 2004.

VIGANÒ, P. *et al.* Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 18, n. 2, p. 177-200, Apr. 2004.

VINATIER, D. *et al.* Theories of endometriosis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 96, n. 1, p. 21-34, May 2001.

VON RECKLINGHAUSEN, F. Adenomyomas and cystadenomas of the wall of the uterus and tube their origin as remnants of the wolffian body. **Wien Klin Wochenschr**, v. 8, p. 530, 1896.

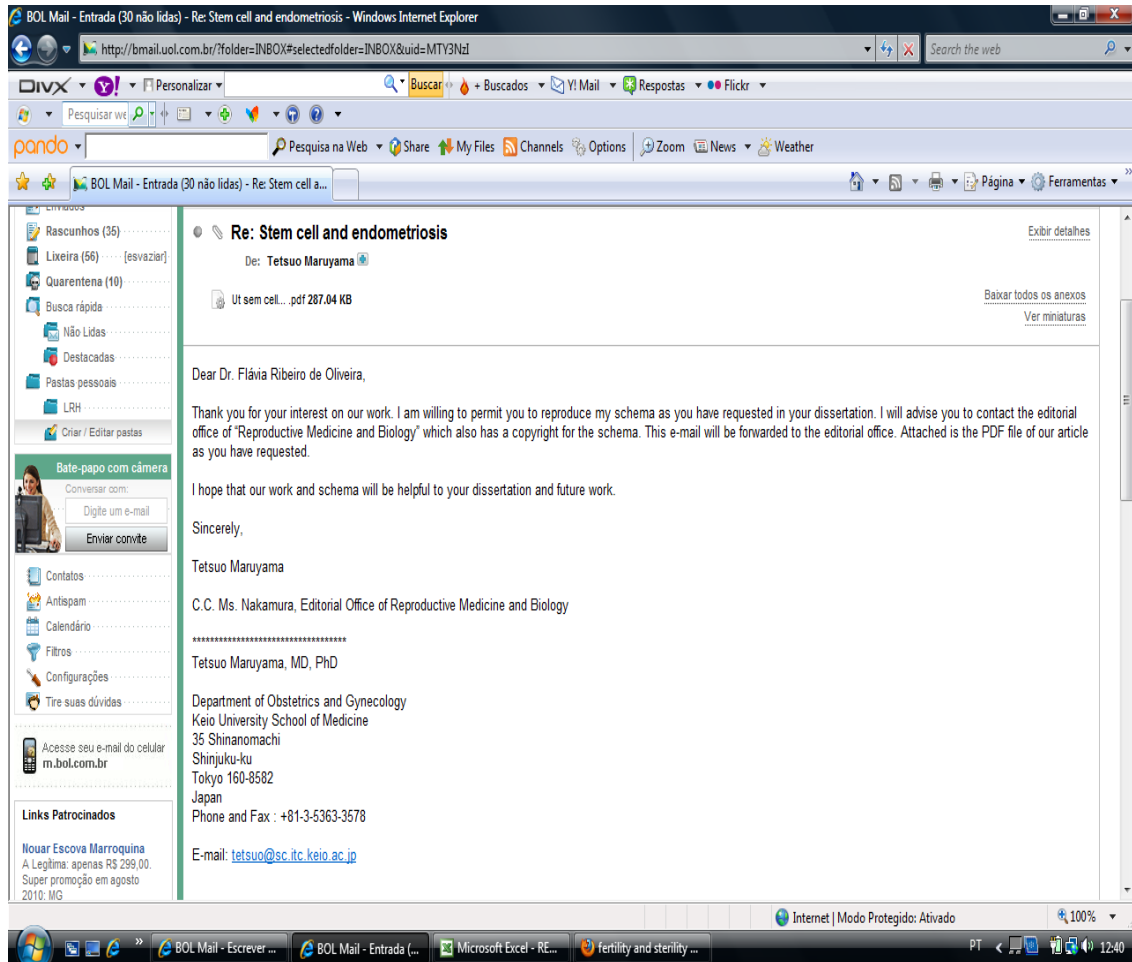
VOSSE, B.A. *et al.* Background staining of visualization systems in immunohistochemistry: comparison of the Avidin-Biotin Complex system and the EnVision+ system. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v. 15, n. 1, p. 103-7, Mar. 2007.

WOLFF, E.F. *et al.* Demonstration of multipotent stem cells in the adult human endometrium by in vitro chondrogenesis. **Reprod Sci**, v. 14, n. 6, p. 524-33, Sep. 2007.

WOLFF, E.F. *et al.* Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a parkinson's disease model. **J Cell Mol Med**, [Epub ahead of print], Apr., 7, 2010.

ANEXOS

Anexo A - *Permission from Tetsuo Matuyama*



Anexo B – Parecer ético

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

Parecer nº. ETIC 0628.0.203.000-09

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

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 15 de março de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Subunidade alfa da inibina e seu correceptor betaglicano em lesões endometrióticas**" 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