

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

**SUBUNIDADE ALFA DA INIBINA
E SEU CORRECEPTOR BETAGLICANO
NA ENDOMETRIOSE**

QUESIA TAMARA MIRANTE FERREIRA VILLAMIL

Belo Horizonte

2010

QUESIA TAMARA MIRANTE FERREIRA VILLAMIL

**SUBUNIDADE ALFA DA INIBINA
E SEU CORRECEPTOR BETAGLICANO
NA ENDOMETRIOSE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ginecologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Medicina.

Área de concentração: Patologia Ginecológica e Reprodução.

Orientador: Dr. Fernando Marcos dos Reis.

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina da UFMG
2010

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).

Ao Arthur,
fiel companheiro, compreensivo e altruísta,
que sempre me motivou nos trabalhos com pesquisa médica.

Às pacientes,
que, com suas dores,
tanto me ensinaram sobre o que é ser mulher.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, porque “*dEle por Ele e para Ele são todas as coisas*¹”, por ter me permitido a realização deste trabalho.

Ao Prof. Fernando Marcos dos Reis, exímio pesquisador e sábio professor, que soube me acolher e me motivar, mostrando as direções que deveriam ser trilhadas para que eu conseguisse alcançar os objetivos tão desejados.

À amiga Flávia Ribeiro, por ter caminhado junto e ter me ensinado tanto, sempre com palavras de motivação e confiança.

Às amigas Cynthia Dela Cruz e Hellen Del Puerto, colegas do laboratório de Biologia Molecular e Cultivo Celular, que apareceram exatamente nos momentos em que precisávamos de ajuda, sem as quais nenhum experimento teria sido realizado. Seu apoio foi essencial para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Wylie Vale (*Salk Institute*, La Jolla, CA, USA), que gentilmente nos enviou os anticorpos anti- α -inibina e antibetaglicano para este estudo.

Ao Prof. Maurício Abrão, da Universidade de São Paulo (USP), pela inestimável colaboração científica.

À Prof^a. Helenice Gobbi, pelo apoio teórico-prático, além de doação de reagentes para os experimentos.

Às técnicas Margareth e Lourdinha, que tão carinhosamente nos receberam no laboratório de imuno-histoquímica. À técnica Laudislina e ao Dr. Renato Santos Laboissiere, da anatomia patológica, pelo apoio com a produção e escolha das lâminas.

À colega Carolina Passos de Rezende, pela disponibilidade e colaboração.

Ao laboratório de Genética Animal da Escola de Medicina Veterinária/UFMG, em especial ao professor Rômulo Cerqueira Leite, por nos fornecer a estrutura necessária para a realização da RT-PCR.

À minha gerente, Andréia Helena de Moraes, que permitiu a flexibilização de horários de trabalho para que eu pudesse finalizar os experimentos.

¹ BIBLIA, N.T.; Carta de Paulo aos Romanos. Versão de João Ferreira de Almeida. Brasília: Sociedade Bíblica Brasileira, 1969. Cap 11, vers. 36.

Aos colegas do Núcleo Bem Nascer, pelo exemplo ético e incentivo constante na prática médica.

Aos meus pais, que me deram asas aos 15 anos, permitindo que eu partisse para uma cidade a quase 1000 km de distância de casa, tornando possível meu sonho de estudar na UFMG e me envolver com o mundo científico.

Ao Arthur, amor para toda a vida, fonte de paz e inspiração durante a caminhada.

À Tia Rachel e ao Tio Genison, meus “pais postiços”, que deram todo o apoio nos momentos difíceis.

Por fim, agradeço especialmente às pacientes, mulheres de todos os tipos e origens, que sem hesitar cederam material para esta pesquisa, mesmo sabendo que talvez muito tempo ainda se passe até que tenhamos respostas para suas perguntas sobre a endometriose.

*“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para
todo o propósito debaixo do céu:
Há tempo de nascer, e tempo de morrer:
tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou:
Tempo de matar, e tempo de curar:
tempo de derribar, e tempo de edificar:
Tempo de chorar, e tempo de rir:
tempo de prantear, e tempo de saltar:
Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras:
tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar:
Tempo de buscar, e tempo de perder:
tempo de guardar, e tempo de deitar fora:
Tempo de rasgar, e tempo de coser:
tempo de estar calado, e tempo de falar:
Tempo de amar, e tempo de aborrecer:
tempo de guerra, e tempo de paz.”*

Palavras do pregador, livro de Eclesiastes, Bíblia Sagrada.

RESUMO

A endometriose é caracterizada pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina, causando dor pélvica e infertilidade. É uma doença de causa multifatorial e ainda pouco conhecida, o que torna importante o estudo dos mecanismos envolvidos na sua patogênese. Inibinas e ativinas são membros da superfamília dos fatores transformadores do crescimento β (TGF- β). Betaglicano é um correceptor da inibina. Essas moléculas estão envolvidas em vários processos biológicos, como proliferação, diferenciação e determinação do destino celular. Pesquisas sugerem que inibinas e ativinas estão associadas à patogênese da endometriose. O presente estudo objetivou avaliar a distribuição proteica e os níveis de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) da subunidade α da inibina e do betaglicano em tecidos endometrióticos e no endométrio eutópico. RT-PCR semiquantitativo e imuno-histoquímica foram realizados para avaliar a expressão gênica e a distribuição tecidual da α -inibina e do betaglicano, em amostras de lesões endometrióticas intestinais e no endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose. Expressão gênica e proteica para α -inibina e betaglicano foi demonstrada tanto no endométrio eutópico quanto ectópico. Foi observado aumento da expressão gênica da α -inibina e do betaglicano no endométrio eutópico de mulheres com endometriose, em relação a controles saudáveis. A análise imuno-histoquímica revelou marcação para α -inibina e betaglicano em ambos os compartimentos endometriais: glandular e estromal. Menor expressão da α -inibina e do betaglicano foi observada nas lesões endometrióticas, quando comparadas com o endométrio eutópico das mesmas pacientes. Em suma, os resultados permitiram concluir que a presença da α -inibina e de seu correceptor betaglicano nos endométrio eutópico e ectópico sugere possível implicação dessas moléculas na etiopatogênese da endometriose.

Palavras-chave: Endométrio. Endometriose. Imuno-histoquímica. α -inibina. Betaglicano.

ABSTRACT

Endometriosis is a complex gynecologic disease associated with pelvic pain and infertility. It's characterized by the presence of ectopic endometrial tissue and its pathogenesis remains to be fully described. Inhibins and activins are glycoproteins that belong to the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily, and betaglycan is an inhibin coreceptor. These molecules were identified as potential modulators of many biologic processes including cell proliferation, differentiation, and cellular fate determination. Also, previous studies have linked these glycoproteins and proteoglycan to the endometriosis pathogenesis. The aim of the present study was to evaluate the mRNA levels and protein distribution of the α -inhibin subunit and betaglycan in endometriotic lesions and eutopic endometrium from women with or without endometriosis. Alfa-inhibin subunit and betaglycan gene expression were evaluated by quantitative real time PCR, and tissue protein distribution was assessed by immunohistochemistry. Alfa-inhibin and betaglycan mRNA's were expressed by eutopic endometrium from women with or without endometriosis but it was significantly higher in the endometrium of women with endometriosis. Immunostaining for α -inhibin and betaglycan was found in both endometrial compartments: glands and stroma, and also in eutopic and ectopic endometrium. In patients with endometriosis, the α -inhibin and betaglycan tissue distribution were less abundant in ectopic lesions than in eutopic endometrium. In conclusion, our results showed gene and protein expression of α -inhibin and betaglycan in eutopic and ectopic endometrium. These findings suggest that these molecules could play a role in the pathogenesis of endometriosis.

Key-words: Endometrium; Endometriosis; Immunohistochemistry; inhibin-alpha; betaglycan

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMP	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COEP	Comitê de Ética e Pesquisa
COX 2	Ciclo-oxigenase 2
Ct	<i>Theresold cycle</i>
DAB	Diaminobenzidina
DBS	<i>Diagnostic bio system</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dnase	Deoxyribonuclease
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FA	Fragmento amplificado
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FLRG	<i>Activin-binding protein</i>
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate deydrogenase</i>
GDF	<i>Growth and differentiation factor</i>
HE	Hematoxilina e eosina
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
INCT	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
LH	Hormônio luteinizante
LIF	<i>Lymphocyte inhibitory factor</i>
MIF	<i>Müllerian-inhibiting factor</i>
min	Minuto
MMP	Metaloproteinases
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NK	<i>Natural killer</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase

RNA	Ácido ribonucleico
Rnase	Ribonuclease
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
T	Tamanho
TGF- β	Fator transformador do crescimento β
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USA	<i>United States of America</i>
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

FIGURA 1 Fisiopatologia da endometriose.....	20
FIGURA 2 Constituição das inibinas e ativinas a partir da ligação de subunidades α e β	23
FIGURA 3 Mecanismo de ação celular da ativina: ligação em ActRII, ativação de ActRI e sinais por meio de Smads.....	25
FIGURA 4 Mecanismo de ação celular da inibina: ligação em ActRII e bloqueio à ligação da ativina.....	26
FIGURA 5 Extração de RNA total pelo método do Trizol.....	36
FIGURA 6 Curvas de dissociação e de diluição da α -Inibina.....	42
FIGURA 7 Curvas de dissociação e de diluição do betaglicano.....	43
FIGURA 8 Microscopia com aumento de 200 X para imunolocalização da α -inibina.....	46
FIGURA 9 Microscopia com aumento de 200 X para imunolocalização do betaglicano	49
FIGURA 10 Processamento intracelular das subunidades α e β da inibina.....	52

Gráficos

GRÁFICO 1 Expressão do gene da α -inibina no endométrio de mulheres com e sem endometriose.....	43
GRÁFICO 2 Expressão do gene do betaglicano no endométrio de mulheres com e sem endometriose.....	44

Quadro

QUADRO 1 Oligonucleotídeos <i>primers</i> utilizados para a reação de PCR em tempo real dos genes-alvo da α -inibina, betaglicano e o gene de referência <i>glyceraldehyde 3-phosphate deydrogenase</i> (GAPDH).....	37
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Proporção de amostras que expressaram α -inibina e betaglicano nos três grupos estudados, de acordo com o compartimento tecidual analisado.....	47
TABELA 2 Avaliação da intensidade da imunocoloração da subunidade α da inibina e do betaglicano nas amostras estudadas.....	47

SUMÁRIO²

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Endometriose.....	18
2.1.1 Conceito e epidemiologia.....	18
2.1.2 Origem e fisiopatologia.....	18
2.2 Inibinas e ativinas.....	22
2.2.1 Inibinas e ativinas: constituição molecular e mecanismo de ação celular.....	22
2.2.2 Inibinas e ativinas: funções em diferentes tecidos e células.....	26
2.2.3 Inibinas e ativinas nas doenças proliferativas.....	27
2.2.4 Inibinas, ativinas e betaglicano no endométrio humano.....	28
2.2.5 Inibinas e ativinas na endometriose.....	28
2.2.5.1 Betaglicano na endometriose.....	32
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4 PACIENTES E MÉTODOS.....	34
4.1 Considerações éticas.....	34
4.2 Reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa.....	34
4.2.1 Pacientes.....	34
4.2.2 Coleta e processamento das amostras.....	34
4.2.3 Extração de ácido ribonucleico (RNA) total.....	35
4.2.4 Síntese do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) pela transcrição reversa (RT).....	35
4.2.5 Oligonucleotídeos específicos.....	36
4.2.6 Realização da RT-PCR em tempo real.....	37
4.2.7 Análise estatística.....	38

² Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas.

4.3 Imuno-histoquímica.....	39
4.3.1 Pacientes.....	39
4.3.2 Coleta e processamento das amostras.....	39
4.3.3 Realização do experimento.....	40
4.3.4 Avaliação da intensidade da coloração imuno-histoquímica.....	41
4.3.5 Análise estatística.....	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 Expressão do mRNA da α -inibina.....	42
5.2 Expressão do mRNA do betaglicano.....	43
5.3 Imunolocalização da α -inibina.....	44
5.4 Imunolocalização do betaglicano.....	48
6 DISCUSSÃO.....	50
6.1 Expressão da α -inibina na endometriose.....	50
6.1.1 α -inibina no endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose.....	50
6.1.2 Inibina no endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose.....	53
6.2 Expressão do betaglicano na endometriose.....	54
6.2.1 Betaglicano no endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose.....	54
6.2.2 Betaglicano no endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose.....	55
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
8 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXO	66

1 INTRODUÇÃO

Desde a descrição, por Sampson, em 1921, dos “cistos de chocolate” do ovário, a comunidade científica não mede esforços em fazer pesquisas que possam esclarecer os mecanismos fisiopatológicos da endometriose. Uma doença debilitante, causadora de dor e infertilidade nas mulheres acometidas, que se origina da implantação ectópica de fragmentos de endométrio refluídos pela tuba uterina (BULUN, 2009; SAMPSON, 1921). Apesar de não ser completamente compreendida, sabe-se que sua gênese é multifatorial, envolvendo a combinação de fatores genéticos, anatômicos, imunológicos e humorais (NAP *et al.*, 2004).

Inibinas e ativinas são membros da superfamília dos fatores transformadores do crescimento β (*transforming growth factors* – TGF- β) e têm importância essencial em muitos processos biológicos como proliferação, diferenciação e determinação do destino celular. Seus efeitos biológicos são exercidos a partir da ligação no receptor serina-treonina-quinase tipo II (ActRII). A ativina, ao se ligar ao ActRII, faz com que este ative o receptor tipo I (ActRI), que inicia uma cascata de sinais intracelulares via proteínas Smad, as quais, por fim, regularão a transcrição gênica. A inibina, peptídeo com ação antagônica à ativina, também se liga ao ActRII. Entretanto, age bloqueando este, não permitindo a ativação do ActRI. Como as duas moléculas competem pelo mesmo receptor, um cofator, ancorado à inibina, faz com que esta tenha mais afinidade pelo ActRII. Conhecido como betaglicano, esse correceptor de membrana se liga especificamente à subunidade α da inibina e facilita a ligação da inibina ao ActRII, dificultando, dessa maneira, o acesso da ativina ao receptor (TSUCHIDA *et al.*, 2009).

Evidências atuais têm associado inibinas e ativinas a doenças proliferativas responsivas a hormônios esteroides, como câncer de ovário e de mama (CHEN *et al.*, 2006; STENVERS; FINDLAY, 2009). Entre outras, o endométrio é importante fonte produtora desses peptídeos. Doenças proliferativas endometriais, como hiperplasia e carcinoma, têm sido relacionadas à alteração da expressão local de inibinas e ativinas (MYLONAS *et al.*, 2009; OTANI *et al.*, 2001). Estudos recentes também mostraram que, no endométrio eutópico de mulheres com endometriose,

a expressão de inibinas e ativinas é alterada, quando comparada com controles saudáveis (ROMBAUTS *et al.*, 2006; TORRES *et al.*, 2009).

Sabe-se que, na endometriose, o padrão de produção de hormônios e citocinas endometriais é diferente e que no implante endometriótico são expressos diversos peptídeos moduladores da inflamação e da proliferação celular (BULUN, 2009). Sendo assim, entre tantas outras moléculas já descritas, inibinas e ativinas emergem como uma nova família de peptídeos que sinalizam ter funções na patogênese da endometriose, uma doença que, apesar de tão estudada, ainda se aparenta tão complexa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Endometriose

2.1.1 Conceito e epidemiologia

A endometriose é uma condição ginecológica que atinge mulheres em idade reprodutiva e pode ser causa de dor e infertilidade. É definida pela presença de glândulas e estroma endometrial viáveis fora da cavidade uterina. A doença acomete principalmente o peritônio da pelve, mas pode ocorrer também nos ovários, no septo reto-vaginal e em outros locais, como diafragma, pleura e pericárdio. A prevalência estimada é de 6 a 10% na população geral e de 50 a 60% nas mulheres que têm dor pélvica e/ou infertilidade (GUIDICE, 2010).

Os fatores de risco para endometriose são: obstrução do trato menstrual (como em mulheres com anomalias müllerianas), exposição prolongada ao estrogênio, fluxo menstrual aumentado e ciclos menstruais curtos. Como fatores de proteção destaca-se lactação prolongada e múltiplas gestações (BULUN, 2009; GAZVANI; TEMPLETON, 2002; GUIDICE, 2010).

A predisposição genética para a endometriose é sugerida por estudos que mostram que parentes de primeiro grau de mulheres com endometriose grave têm alto risco de desenvolver a doença. Parece que o padrão de herança é poligênico e multifatorial (BISCHOFF; SIMPSON, 2004).

2.1.2 Origem e fisiopatologia

Sampson, em 1927, foi o primeiro a propor um mecanismo etiopatogênico para a endometriose (SAMPSON, 1927a). Segundo ele, **fragmentos do endométrio menstrual passariam através das tubas uterinas** e se implantariam na superfície peritoneal. Entretanto, essa teoria não conseguiu explicar a ocorrência de endometriose em tecidos extrapélvicos. Mas Sampson postulou, também, outra hipótese: a de que o tecido menstrual poderia alcançar o

sítio ectópico através de **vasos linfáticos ou sanguíneos**, explicando, assim, os implantes endometrióticos em órgãos como cérebro e pulmões (SAMPSON, 1927b).

Outras teorias também foram formuladas por outros pesquisadores: a **teoria dos resquícios embrionários**, que sugere que o endométrio ectópico se desenvolve a partir dos remanescentes dos ductos de Müller e Wolffian (VON RECKLINGHAUSEN, 1896); e a **hipótese da metaplasia celômica**, que propõe que as lesões endometrióticas se originam da diferenciação de células mesoteliais presentes no peritônio, em tecido endometrial (GRUENWALD, 1942). Recentemente, um novo mecanismo para a gênese das lesões endometrióticas foi proposto: **células tronco-progenitoras**, já identificadas no endométrio, que poderiam ser a resposta para a origem do tecido endometrial ectópico (MARUYAMA *et al.*, 2010).

Apesar de a hipótese da menstruação retrógrada de Sampson ser a mais aceita até hoje para explicar a origem da endometriose, ainda não foi elucidado por que, se 90% das mulheres têm menstruação retrógrada, apenas 6 a 10% têm endometriose. Extensiva pesquisa tem sido feita na tentativa de destrinchar a complicada teia de fatores que interagem promovendo aderência e invasão das células endometriais (NAP *et al.*, 2004).

Os trabalhos relevantes sobre a fisiopatologia da endometriose confirmam a ideia de que o endométrio eutópico de mulheres com endometriose possui uma anormalidade intrínseca que permite que, quando fora do seu sítio, esse tecido se fixe, sobreviva, invada e estabeleça seu suprimento sanguíneo no peritônio. Essa característica intrínseca das mulheres com endometriose seria, então, um fator determinante da existência ou não da doença. Além de defeitos imunológicos e características próprias do fluido peritoneal, no endométrio eutópico de mulheres com endometriose ocorre ativação de cascatas biossintéticas, o que leva à produção excessiva de estrogênio, progesterona, citocinas, prostaglandinas e metaloproteinases (MMPs) (FIG. 1) (BULUN, 2009; NAP *et al.*, 2004).

A fisiopatologia da endometriose pode ser explicada em quatro etapas:

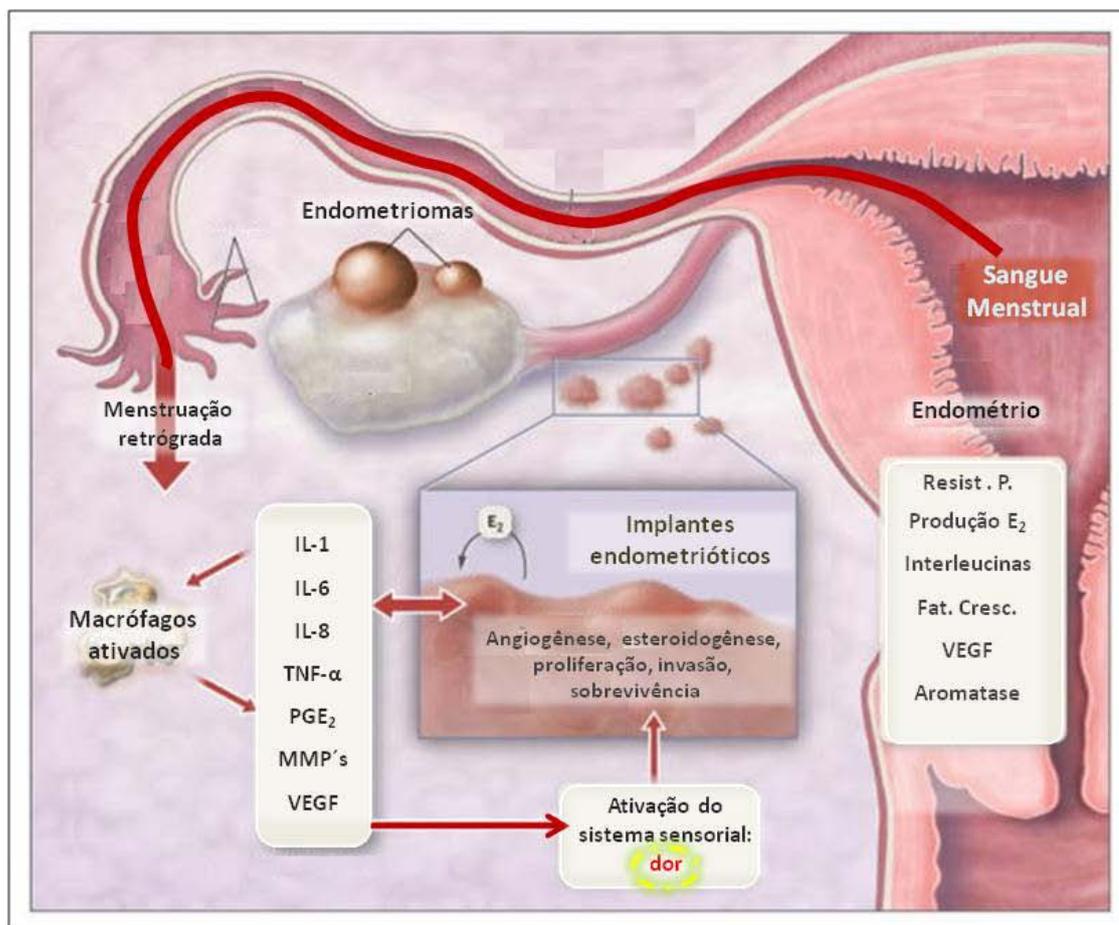


FIGURA 1 – Fisiopatologia da endometriose.

Fonte: Giudice (2010), com adaptações.

A) Sobrevivência na cavidade abdominal

Para a sobrevivência do tecido endometrial ectópico e consequente sucesso dos implantes, ocorre redução na apoptose celular, devido à baixa expressão de genes pró-apoptóticos e alta expressão de genes antiapoptóticos (GIUDICE; KAO, 2004).

Escapar da vigilância da defesa imunológica é, então, o próximo desafio das células refluídas no peritônio. Sua chegada produz intensa resposta inflamatória, com altos níveis de citocinas (interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8, fator de necrose tumoral - *tumor necrosis factor* – TNF - e interferon γ). Estas, por sua vez, recrutam macrófagos e linfócitos T. Entretanto, foi demonstrado que, nas mulheres com endometriose, há redução da capacidade fagocítica dos

macrófagos peritoneais, além de diminuição da citotoxicidade mediada por linfócitos T e de alteração na atividade das células *natural killer* (NK). Estas alterações parecem possibilitar que o tecido invasor vença o sistema imune local e se estabeleça (GAZVANI; TEMPLETON, 2002; GIUDICE; KAO, 2004; NAP *et al.*, 2004).

B) Aderência à superfície peritoneal e invasão

Para se implantar no peritônio, o tecido endometrial deve ser capaz de aderir à superfície peritoneal, invadindo a membrana basal e a matriz extracelular. A quebra e o remodelamento da matriz extracelular - que é constituída de colágenos, proteoglicanas e glicoproteínas - são regulados pelas MMPs, enzimas normalmente expressas pelo endométrio durante a menstruação e na fase proliferativa. Durante a fase secretora, a ação progestínica suprime sua atividade. Estudos em animais mostram que a inibição das MMPs pode prevenir a formação da lesão endometriótica. Como as mulheres com endometriose apresentam resistência à progesterona, uma expressão persistente das MMPs nessa fase aumenta a capacidade invasiva do tecido endometrial retrógrado no mesotélio peritoneal (COLLETTE *et al.*, 2006; NAP *et al.*, 2004).

C) Aquisição de suprimento sanguíneo

A angiogênese é um processo que ocorre ativamente no endométrio eutópico, principalmente durante o reparo pós-menstrual e na formação das arteríolas espiraladas. Várias citocinas angiogênicas, incluindo interleucinas, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento similar à insulina, fator de crescimento derivado de plaquetas e o fator de crescimento endotelial (*vascular endothelial growth factor* - VEGF), são expressas pelas células endometrióticas, o que poderia contribuir substancialmente para a angiogênese que acompanha o estabelecimento das lesões endometrióticas na cavidade peritoneal. O VEGF, um potente fator angiogênico, é expresso nas lesões endometrióticas em grau mais alto que no endométrio eutópico e sua expressão no endométrio eutópico de mulheres com

endometriose é mais acentuada que nos controles saudáveis (GIUDICE; KAO, 2004; MACHADO *et al.*, 2010; TAN *et al.*, 2002).

D) Sobrevivência pós-implantação

Alterações na produção e na ação dos esteroides sexuais têm muita importância na fisiopatologia da endometriose, doença sabidamente “alimentada” pelo estrogênio. A *aromatase*, enzima chave na síntese do estradiol, que é normalmente ausente no endométrio, é expressa no endométrio de mulheres com endometriose e, ainda, em mais alto grau nos implantes endometrióticos. Estes, associados aos ovários e ao tecido periférico (gordura e pele), são responsáveis por manter alta a oferta de estradiol para os implantes endometrióticos e, assim, garantir sua sobrevivência após implantação (BULUN, 2009; NAP *et al.*, 2004).

Em relação à progesterona, em mulheres com endometriose é observada resistência à sua ação, provavelmente devido a uma alteração na expressão de seus receptores. Assim, a resistência progestínica endometrial aumenta ainda mais a ação estrogênica local, configurando alterações hormonais locais importantes na manutenção dos implantes (BULUN, 2009; GIUDICE; KAO, 2004).

As prostaglandinas são produzidas em excesso no útero e nos implantes das mulheres com endometriose, por haver aumento da expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX 2) nesses tecidos. O estradiol também ativa a síntese de COX 2 e de prostaglandinas. Estas estimulam a atividade da aromatase, o que também contribui para o incremento da atividade estrogênica nas lesões endometrióticas. Como resultado, tem-se uma alça de retroalimentação, responsável por manter os implantes, permitindo sua sobrevivência (BULUN, 2009; NAP *et al.*, 2004).

2.2 Inibinas e ativinas

2.2.1 Inibinas e ativinas: constituição molecular e mecanismo de ação celular

Inibinas e ativinas são proteínas da família dos TGF- β , uma superfamília que resulta da associação de subunidades α e/ou β . Esta família contém 33 membros que agem em vários processos essenciais de proliferação, diferenciação e desenvolvimento celular, entre eles: miostatinas, fator de crescimento e diferenciação (*growth and differentiation factor* – GDF), fator de diferenciação 11, nodal, proteínas morfogenéticas do osso (*bone morphogenetic proteins* – BMP), fator inibidor linfocitário (*Lymphocyte inhibitory factor* - LIF) e fator inibidor mülleriano (*Müllerian-inhibiting factor* - MIF). Ambas as subunidades, α e β , são sintetizadas como polipeptídeos precursores, que são dimerizados e clivados, dando origem a um polipeptídeo dimérico biologicamente ativo (CHEN *et al.*, 2006; GRAY; BILEZIKJIAN; VALE, 2002; TSHUCHIDA *et al.*, 2009).

Inibinas são heterodímeros formados pela combinação de uma subunidade α e uma subunidade β . Há dois tipos de inibinas, de acordo com o tipo da subunidade β (β_A ou β_B) presente na inibina A (formada pelas subunidades α e β_A) e inibina B (formada pelas subunidades α e β_B). Ativinas são homodímeros formados pela combinação de duas subunidades β ligadas por uma ponte de bissulfeto. Existem três tipos de ativinas, também nomeadas de acordo com o tipo de subunidade β : ativina A (formada pelas subunidades β_A e β_A), ativina B (formada pelas subunidades β_B e β_B) e ativina AB (formada pelas subunidades β_A e β_B) (FIG. 2) (GRAY; BILEZIKJIAN; VALE, 2002; TSHUCHIDA *et al.*, 2009).

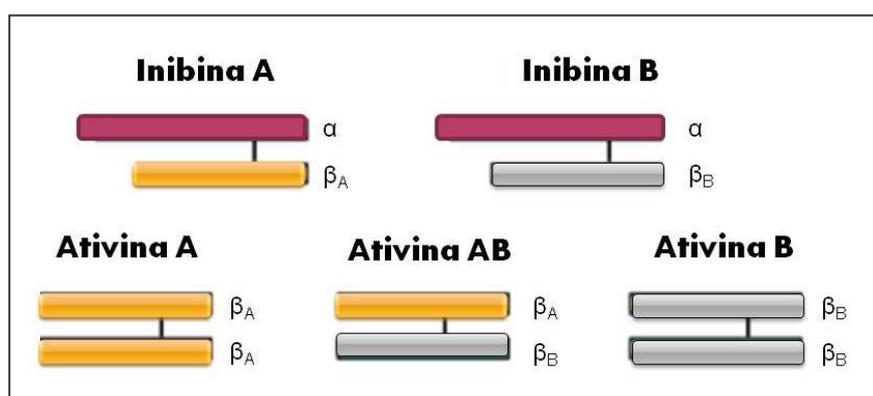


FIGURA 2 – Constituição das inibinas e ativinas a partir da ligação de subunidades α e β .

Mottram e Cramer (1923) foram os primeiros autores a publicar o conceito de um fator gonadal com ação hipofisária. Mas apenas em 1932 a inibina foi

descrita por McCullagh como um fator gonadal não esteroide, solúvel em água, produzido em testículos, que poderia prevenir mudanças morfológicas na hipófise após a castração. Era sabido que, após a destruição dos túbulos seminíferos de ratos, ocorria hipertrofia da hipófise, causada pela falta de um “fator” provavelmente derivado dos túbulos seminíferos. Quando se constatou que a hipertrofia da hipófise poderia ser inibida pela administração, nos animais, de um extrato testicular aquoso, esse “fator” inibitório foi então chamado de inibina (McCULLAGH, 1932).

Estudos subsequentes refinaram a definição da inibina, demonstrando que ela exerceria efeito direto nas células gonadotróficas da hipófise, causando supressão na liberação de hormônio folículo-estimulante (FSH), sem alterar a liberação do hormônio luteinizante (LH). Também foi isolada, no fluido folicular de suínos, uma outra glicoproteína dimérica, parecida com a inibina, que, por ativar a liberação de FSH, foi então chamada de ativina (VALE *et al.*, 1986).

Os efeitos biológicos das inibinas e ativinas são efetivados pela ligação a um receptor serina-treonina-quinase tipo II (ActRII), que é sabidamente ligante de outras moléculas da mesma superfamília TGF- β : miostatina, fator de crescimento e diferenciação 11 e nodal, justificando-se a semelhança de atividades celulares desses ligantes com a ativina. Após ligação da ativina no ActRII, é formado um complexo ligante/ActRII e este recruta o receptor tipo I (ActRI), que é, então, fosforilado, tornando-se ativo. A partir daí, inicia-se uma cascata de sinais intracelulares via proteínas Smad, que irão, por fim, regular a transcrição gênica, em cooperação com fatores nucleares (FIG. 3) (GRAY; BILEZIKJIAN; VALE, 2002; HARRISON, 2004; TSUCHIDA *et al.*, 2009).

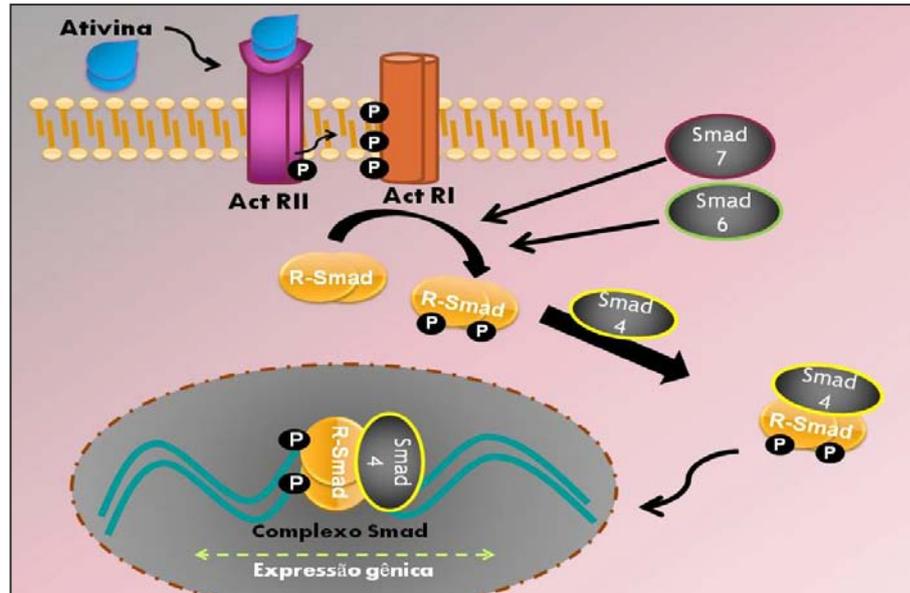


FIGURA 3– Mecanismo de ação celular da ativina: ligação em ActRII, ativação de ActRI e sinais por meio de Smads.

Inibina também exerce sua ação celular a partir da ligação no ActRII, porém com afinidade significativamente mais reduzida que a da ativina. Quando se liga no ActRII, a inibina antagoniza a ação da ativina, por não permitir que este recrute ActRI. Para que a inibina consiga deslocar a ativina do seu receptor, é necessário um correceptor ancorado à membrana celular, o betaglicano (também chamado de receptor TGF- β tipo III ou TGF- β III), que se liga especificamente à subunidade α da inibina e permite sua ligação ao ActRII, desta maneira impedindo o acesso da ativina ao ActRII (FIG. 4) (GRAY; BILEZIKJIAN; VALE, 2002; STENVERS; FINDLAY, 2009).

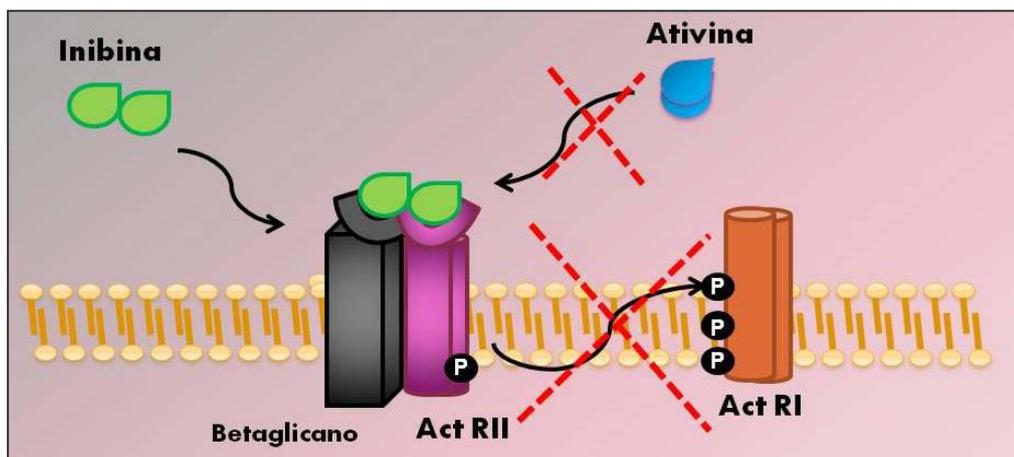


FIGURA 4 – Mecanismo de ação celular da inibina: ligação em ActRII e bloqueio à ligação da ativina.

Ativinas e inibinas raramente circulam livres. Tanto no sangue quanto no fluido extravascular, são encontradas ligadas à folistatina, à α 2-macroglobulina ou à *activin-binding protein* (FLRG). Quando ligadas a essas proteínas, é formado um complexo que neutraliza sua bioatividade. A afinidade da ativina pela folistatina é semelhante à afinidade da ativina pelo ActRII. Assim, a concentração de folistatina regula a biodisponibilidade da ativina em nível tecidual (CHEN *et al.*, 2006; JONES *et al.*, 2002; LUISI *et al.*, 2001).

2.2.2 Inibinas e ativinas: funções em diferentes tecidos e células

Desde que foram isoladas e caracterizadas com base na secreção do FSH pela hipófise anterior, muitas outras funções celulares têm sido associadas às ativinas e inibinas, incluindo controle na proliferação celular, diferenciação e determinação do destino celular, apoptose, metabolismo, reposta à injúria e inflamação e função endócrina (CHEN *et al.*, 2006).

Parece que a maior fonte produtora de inibinas e ativinas circulante é o tecido ovariano. Entretanto, essas moléculas são expressas também em tecidos extragonadais, como placenta, hipófise, adrenais, fígado, tireoide, cérebro e medula óssea (COBELLIS *et al.*, 2002; LUISI *et al.*, 2001; ROMBAUTS; HEALY, 1995).

Nos tecidos reprodutivos, ativinas e inibinas são reconhecidas como fatores de crescimento com ações autócrina e parácrina. Mudanças na concentração sérica desses peptídeos ocorrem de acordo com a fase do ciclo menstrual. Os níveis de inibina caem logo após a ovulação e começam a aumentar novamente paralelamente ao estrogênio e à progesterona, na fase lútea inicial. Seu pico acontece no meio da fase lútea, com rápido declínio no seu fim. Caso se verifique gravidez e o corpo lúteo permaneça, os níveis de inibina permanecem altos. Se não houver gravidez, registra-se queda em seus níveis, com aumento discreto durante fase proliferativa, alcançando níveis altos apenas na periovulação (ROMBAUTS; HEALY 1995).

No ovário, inibinas e ativinas agem em conjunto para promover a seleção do folículo dominante e modulam a esteroidogênese nas células da teca. A ativina estimula a indução de receptores de FSH nas células da granulosa, além de

estimular a produção de inibina e de progesterona. A inibina aumenta a produção de androgênios na teca e a ativina inibe essa produção. A ativina promove a maturação do oócito e a inibina antagoniza essa ação. A ativina regula a diferenciação das células da granulosa, prevenindo a luteinização precoce, enquanto a inibina auxilia na aromatização de androgênios nas células da granulosa (ROMBAUTS; HEALY 1995).

2.2.3 Inibinas e ativinas nas doenças proliferativas

A primeira relação de inibinas e ativinas com doenças proliferativas foi feita em 1992, quando foi demonstrado que, após deleção do gene da α -inibina, camundongos desenvolviam tumores gonadais. Como os animais deficientes de α -inibina apresentavam níveis séricos elevados de ativina A, o efeito oncogênico pôde ser explicado tanto pela falta de atividade supressora tumoral da inibina como pelo aumento da atividade da ativina na ausência da inibina (MATZUK, 1992).

Estudos recentes relacionam inibinas e ativinas a diversas linhagens de câncer, como câncer de mama, próstata e ovário, entre outros. Enquanto a inibina tem sido considerada um fator supressor tumoral, a ativina parece ter comportamento variável: associa-se a agressividade e mau prognóstico tumoral em algumas linhagens, mas apresenta atividade antitumorigênica em outras (CHEN *et al.*, 2006; STELLER *et al.*, 2005; STENVERS; FINDLAY, 2009).

Em relação ao correceptor betaglicano, alguns estudos também sugerem função como supressor em células cancerígenas. Pesquisas com células de tumor da granulosa mostraram que ele inibe a capacidade de invasão celular e cicatrização. Além disso, a partir da avaliação da expressão de formas mutantes desse peptídeo, demonstrou-se que seus efeitos inibitórios estão fortemente atrelados à região de ligação da inibina (BILANDZIC *et al.*, 2009; GATZA; OH; BLOBE, 2010).

2.2.4 Inibinas, ativinas e betaglicano no endométrio humano

As três subunidades α , (βA e βB) são expressas pelo endométrio, comprovadamente nas glândulas, no epitélio luminal, no estroma e no endotélio vascular. Variações cíclicas de expressão são descritas, com aumento progressivo com o avançar do ciclo e pico na fase secretora tardia (LEUNG; SALAMONSEN; FINDLAY, 1998; MYLONAS *et al.*, 2004), pois inibinas e ativinas atuam no controle da decidualização e no reparo pós-menstrual do endométrio (JONES *et al.*, 2006a; JONES; SALAMONSEN; FINDLAY, 2002; TU'UHEVAHA *et al.*, 2009). Os receptores ActRI, ActRII e betaglicano também são expressos tanto no estroma quanto no epitélio endometrial (FERREIRA *et al.*, 2008; JONES *et al.*, 2002).

Estudos têm demonstrado aumento na produção de ativina em células endometriais neoplásicas, quando comparadas com células endometriais normais, o que sugere que ela estimule a proliferação celular em tumores endometriais (PETRAGLIA *et al.*, 1998). A expressão da α -inibina é diminuída em células de hiperplasia e câncer do endométrio, enquanto que sua presença nesses tumores representa melhor prognóstico da doença, provavelmente por ser um fator limitador de crescimento e proliferação endometrial (MYLONAS *et al.*, 2004; 2009).

A expressão do betaglicano também está diminuída no câncer de endométrio (FLORIO *et al.*, 2005). A associação de doenças proliferativas endometriais (hiperplasia e câncer) com baixa expressão de inibina e betaglicano ocorre possivelmente devido à ausência da ação da inibina, impedindo invasão e migração celular, seja direta ou indiretamente, pela falta do betaglicano. Além disto, a baixa expressão de betaglicano e inibina pode aumentar o efeito biológico da ativina, estimulando, assim, a proliferação neoplásica.

2.2.5 Inibinas e ativinas na endometriose

Assim como em outras doenças proliferativas endometriais, como hiperplasia e câncer, parece que inibinas e ativinas também desempenham papel na patogênese da endometriose. Inibina A, B e ativina A estão presentes no fluido

peritoneal de mulheres com endometriose pélvica (FLORIO *et al.*, 1998), células endometrióticas em cultura expressam as subunidades α , βA , βB , o ActRI e o ActRII (FERREIRA *et al.*, 2008; FLORIO *et al.*, 1998) e implantes endometrióticos intestinais exibem as subunidades α e βA (REIS *et al.*, 2001). Recentemente, Mabuchi *et al.* (2010) mostraram que células da endometriose ovariana exibem positividade para a subunidade βA , ativina, receptores da ativina e ípate Smads.

Reis *et al.* (2001) referiram que as subunidades α e βA são expressas tanto nas glândulas quanto no estroma do endometrioma ovariano. Em cultura de células endometrióticas observaram que há menos expressão de βA do que em células do endométrio eutópico. Também evidenciaram mais concentração de inibina A e ativina A no endometrioma do que no fluido peritoneal ou no sangue.

A concentração de ativina A no líquido folicular de mulheres com endometriose foi mais significativa do que em controles sem a doença (AKANDE *et al.*, 2000). Outros estudos salientaram, ainda, que a expressão de ativina A no endométrio eutópico de pacientes com endometriose é mais representativa que nos controles saudáveis, o que sugere envolvimento dessa citocina nas alterações celulares do endométrio de mulheres com endometriose (ROMBAUTS *et al.*, 2006; TORRES *et al.*, 2009). Recentemente, enfatizou-se que a ativina A pode influenciar a gênese da lesão endometriótica, promovendo a invasão peritoneal por células endometriais epiteliais e estromais em um modelo de peritônio *in vitro* (FERREIRA, 2008).

Na avaliação de pacientes inférteis que se submeteram à fertilização *in vitro*, Dokras *et al.* (2000) relataram que a concentração sérica de inibina B é mais baixa nas mulheres com endometriose do que naquelas com outra causa de infertilidade. Desta maneira, a inibina pode ter papel de regulação na capacidade de proliferação e invasão celular na endometriose e, mais especificamente, nos implantes endometrióticos. Sendo assim, a diminuição da expressão da inibina favoreceria a progressão dos implantes endometrióticos, seja por ação parácrina, autócrina ou endócrina.

A progressão da endometriose depende do sucesso das células endometriais ectópicas em se estabelecer no peritônio. Nas várias etapas da patogênese da doença, pode-se depreender as seguintes ações de inibinas e ativinas:

A) Sobrevivência celular na cavidade peritoneal

A endometriose é caracterizada por alto nível de proliferação e redução da apoptose celular (GIUDICE; KAO, 2004). Pesquisas revelaram que a ativina induz apoptose em diversos tecidos e células (CHEN *et al.*, 2006), além de ser um importante regulador da sobrevivência e proliferação de células epiteliais endometriais (TU'UHEVAHA *et al.*, 2009). Como a inibina bloqueia a função celular da ativina, poderia estar relacionada à prevenção da apoptose das células endometriais durante o trânsito para a cavidade peritoneal.

Resistir ao sistema imune é um importante passo para o sucesso na aderência das células endometrióticas ao peritônio. Inibinas e ativinas têm interação com o sistema imune celular e humoral. Já foi demonstrado que influenciam a diferenciação de timócitos (LICONA; CHIMAL-MONROY; SOLDEVILA, 2006) e eritrócitos (HUANG; LI; CHUNG, 2010) e estimulam quimiotáxis e produção de interferon- γ em linfócitos (PETRAGLIA *et al.*, 1991). A ativina é capaz de inibir atividades biológicas da IL-6, com isto causando supressão da proliferação de linfócitos e da atividade fagocítica de monócitos (YU *et al.*, 1998). Sendo assim, um desequilíbrio na expressão de ativinas e inibinas no endométrio, seja em células epiteliais, glandulares ou leucócitos, pode aumentar a capacidade do tecido endometrial ectópico migratório de vencer a repressão imune peritoneal e se implantar.

B) Aderência à superfície peritoneal e invasão

As inibinas e ativinas são associadas a diversas linhagens de câncer, com especial destaque para os tumores ginecológicos responsáveis a hormônios esteroidais (GATZA; OH; BLOBE, 2010; MYLONAS *et al.*, 2004). Como as células endometrióticas têm comportamento de invasividade e proliferação semelhante ao das células cancerígenas, pode haver, também, associação entre inibinas, ativinas e endometriose.

De fato, estudos notificaram que a diminuição da expressão da subunidade α nas células do câncer de endométrio relaciona-se com o estágio de gravidade da doença (FLORIO *et al.*, 2005; MYLONAS *et al.*, 2009). Além disto, lesões pré-cancerígenas têm mais expressão de α -inibina do que as lesões cancerígenas

(MYLONAS *et al.*, 2004), o que sugere que a α -inibina funciona como reguladora da proliferação de células tumorais endometriais.

Supostamente um dos mais importantes mecanismos de invasividade das células endometriais na cavidade peritoneal é o aumento da proteólise tecidual mediada pelas MMPs (COLLETTE *et al.*, 2006). É conhecido que a expressão das MMPs pelas células endometriais, que já é alterada na endometriose (NAP *et al.*, 2004), pode ser aumentada pela ação local da ativina A (JONES *et al.*, 2006a). Em recente estudo com cultura de células endometrióticas em modelo peritoneal, Ferreira *et al.* (2008) comprovaram que a ativina A aumenta a capacidade de invasão tecidual das células endometrióticas, num padrão dose-dependente, o que confirma seu papel na histogênese da lesão endometriótica. Os autores informaram, ainda, que a adição de inibina à cultura celular revoga esse efeito (FERREIRA *et al.*, 2008).

C) Aquisição de suprimento sanguíneo

No endométrio ectópico das lesões endometrióticas, o recrutamento de vasos sanguíneos é essencial para a garantia de fornecimento de oxigênio e nutrientes, sendo que a angiogênese é parte crucial na fisiopatologia da doença (MACHADO *et al.*, 2010). As células tratadas com ativina A apresentaram diminuição da expressão do receptor tipo 2 do VEGF e a ativina foi capaz de inibir angiogênese *in vivo* (BREIT *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2006), podendo ser este mais um dos mecanismos da sua relação com a endometriose.

D) Sobrevivência pós-implantação

As ativinas parecem desempenhar papel na regeneração tecidual, com potencial função no reparo menstrual após menstruação (TU'UHEVAHA *et al.*, 2009). A demonstração da expressão de ativina por leucócitos endometriais confirma sua função como moduladora da resposta inflamatória endometrial associada ao período menstrual (JONES *et al.*, 2000). Em mulheres com endometriose, a variação cíclica hormonal leva a sangramento peritoneal semelhante à menstruação, o que causa inflamação e aderência. Desta forma, variações na expressão de ativina e inibina poderiam favorecer a progressão das

lesões endometrióticas por desregulação na resposta inflamatória no endométrio ectópico durante o período menstrual.

2.2.5.1 Betaglicano na endometriose

Até o presente momento não foram publicados estudos que tenham avaliado a expressão do betaglicano em mulheres com endometriose. Entretanto, a perda de sua expressão durante a progressão de células cancerígenas tem efeitos diretos na migração, invasão, proliferação e angiogênese, sendo, portanto, considerado agente supressor da progressão do câncer e agente supressor de metástases (BILANDZIK *et al.*, 2009; FLORIO *et al.*, 2005; GATZA; OH; BLOBE, 2010; HEMPEL *et al.*, 2007; SHARIFI *et al.*, 2007; TURLEY *et al.*, 2007). Como a afinidade da inibina em bloquear a ação celular da ativina é intrinsecamente dependente da expressão do betaglicano na membrana celular, supõe-se que este exerça também função na regulação da patogênese da endometriose.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a expressão gênica e proteica da subunidade α da inibina em lesões endometrióticas e no endométrio eutópico de mulheres saudáveis e com endometriose.

3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer a comparação da expressão gênica da subunidade da inibina com o seu correceptor betaglicano no endométrio de mulheres com e sem endometriose.
- Descrever a imunolocalização da α -inibina do betaglicano em lesões endometrióticas e no endométrio eutópico saudável e de mulheres com endometriose.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

O protocolo de pesquisa foi aprovado 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 A). O consentimento livre e esclarecido foi obtido de todas as pacientes que participaram do estudo.

4.2 Reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa

4.2.1 Pacientes

Para a RT-PCR foram utilizadas amostras de endométrio eutópico de mulheres encaminhadas ao serviço para propedêutica de infertilidade, que foram distribuídas em dois grupos: pacientes com (n=8) e sem endometriose (n=11). A idade das pacientes variou de 25 a 40 anos e foi semelhante entre os grupos de mulheres com e sem endometriose ($34,6 \pm 1,3$ anos e $32 \pm 1,4$ anos, respectivamente, $p=0,24$). As amostras de endométrio foram coletadas na fase secretora do ciclo menstrual em torno do 18º dia. Em todos os casos de endometriose o diagnóstico da doença foi confirmado previamente por exame anatomopatológico de biópsia de lesão endometriótica extraída durante procedimento cirúrgico.

4.2.2 Coleta e processamento das amostras

As amostras endometriais foram coletadas no 18º dia do ciclo menstrual, por sucção com cureta Pipelle® (Laboratório CCD, Paris, França), e imediatamente congeladas a -80°C .

4.2.3 Extração de ácido ribonucleico (RNA) total

Para a extração do RNA total, as amostras de tecido foram maceradas com o *Mixer Mill* MM 300 (Quiagen) em 1.000 μL de Trizol[®] (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, *United States of America* - USA) e o RNA isolado seguindo o protocolo para o reagente Trizol[®], sem modificações (FIG. 5). Ao término da extração, o RNA foi ressuspenso em 100 μL de H₂O DEPC, livre de ribonuclease (Rnase) e deoxyribonuclease (Dnase) (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA).

Todas as amostras de RNA foram quantificadas no NanoDrop (*Thermo Fisher Scientific*, Wilmington, Delaware, USA), utilizando-se alíquota de 1,5 μL . Com o objetivo de eliminar possível contaminação por ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico, as amostras de RNA foram tratadas com TURBO DNA-free kit (*Ambion Inc.*, Foster, California, USA) e, em seguida, requantificadas no NanoDrop. Ao término dos processos, as amostras foram armazenadas no freezer a -80°C até o uso.

4.2.4 Síntese do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) pela transcrição reversa (RT)

A síntese do cDNA foi feita a partir de 1 μg de RNA total, em volume final de reação de 20 μL , utilizando-se o *kit* SuperScript[™] III *First-Strand Synthesis SuperMix* (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA), com *primers* randômicos para a transcrição reversa do RNA (*random hexamers*), também presentes no *kit*. O RNA foi inicialmente incubado a 65°C por cinco minutos, juntamente com os *primers* randômicos e o tampão de anelamento; e ao término da incubação os tubos foram transferidos imediatamente para o gelo. Em seguida, foram acrescentados ao tubo 10 μL do *mix* de reação (*2X First-Strand Reaction Mix*) e 2 μL da enzima transcriptase reversa (SuperScript[™] III/RNaseOUT[™]). A reação foi incubada a 50°C por 50 minutos e finalizada a 85°C por cinco minutos e os tubos transferidos para o gelo ao final da incubação. As amostras foram armazenadas a -80°C até o uso.

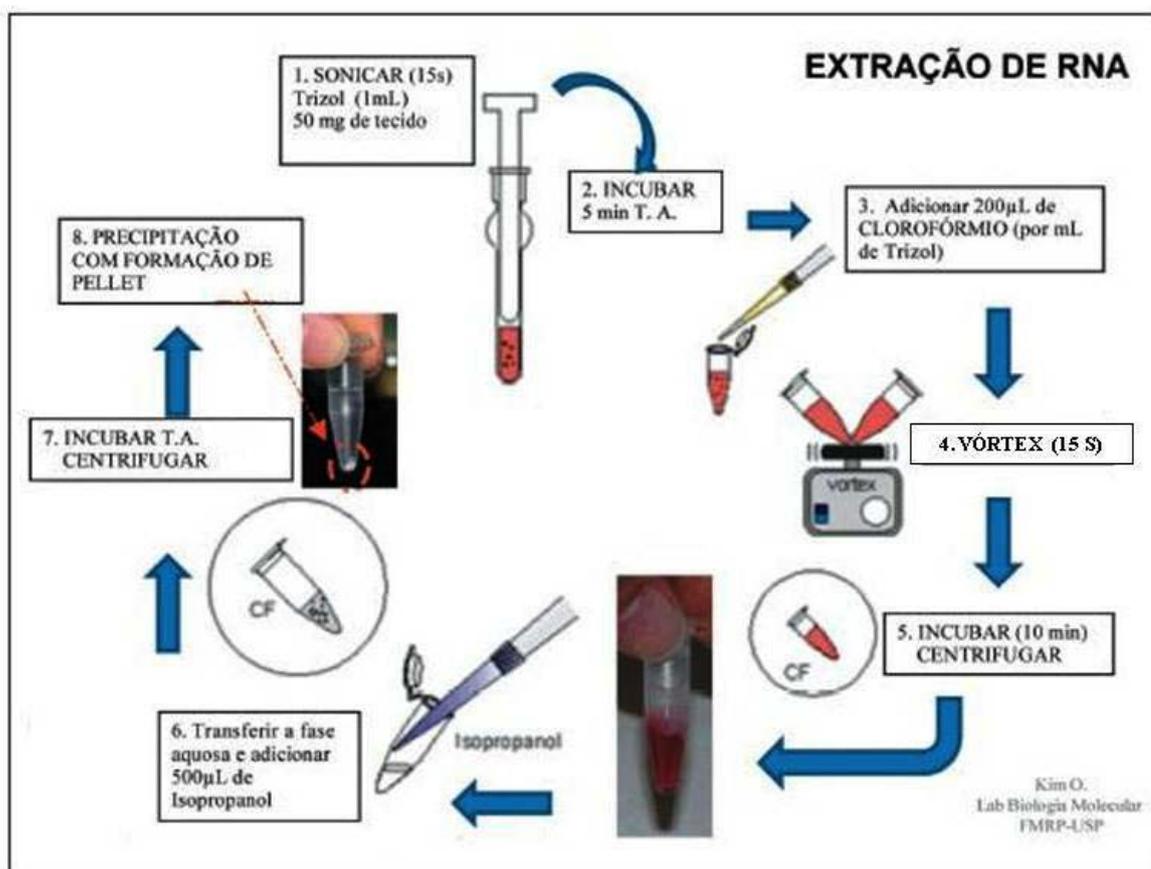


FIGURA 5 – Extração de RNA total pelo método do Trizol.

Fonte: Kim O. Laboratório de Biologia Molecular da FMRP-USP.

4.2.5 Oligonucleotídeos específicos

Os oligonucleotídeos *primers* designados para a transcrição reversa, reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e PCR em tempo real foram aqui estudados e selecionados com base na análise da sequência descrita no GeneBank, obtida no *Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). As sequências foram posteriormente analisadas no *site* da empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT) (<http://www.idtdna.com>), que permitiu a elaboração dos *primers* para as regiões-alvo de cada gene, de acordo com as nossas especificações para as condições de cada *primer*.

Os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen, recebidos liofilizados e, em seguida, dissolvidos em H₂O DEPC, livre de Rnase e Dnase (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA), para concentração final de 100 pmol/µL (concentração para estoque), posteriormente diluídos em alíquotas de 10 pmol/µL

(concentração de uso para a PCR convencional). Foram preparadas alíquotas de 1 pmol/ μ L (concentração de uso para a PCR em tempo real), no dia da PCR em tempo real. Para o aliquotamento dos *primers*, foram empregadas ponteiras com barreira e todo o manuseio verificou-se em capela de fluxo não utilizada para manuseio de fragmentos de PCR.

A localização e sequência dos oligonucleotídeos sintetizados estão apresentadas no QUADRO 1.

QUADRO 1

Oligonucleotídeos *primers* para a reação de PCR em tempo real dos genes-alvo da α -inibina, betaglicano e o gene de referência *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH)

Primers	Sequência de nucleotídeos (nt)	T	Gene Bank	Gene	FA
FwTGF- β -R3Hum (senso)	5'-GGGAAGATCAAGTGTTCCCTCCAA-3'	24 nt		49	84 pb
RevTGF- β -R3 Hum (antisenso)	5'-TGGGTTGAAGGTAAGTCTCAGCAAGGT-3'	24 nt	NM_003243.3	132	
FwAlfa1NIB. Hum (senso)	5'-ACTGCCACAGAGTAGCACTGAACA-3'	24 nt		926	87 pb
RevAlfa1NIB.Hum (antissenso)	5'-AGTGGAAGATGAAACTGGGAGGGT-3'	24 nt	NM_002191.2	1012	
HsGAPDH-F1 (senso)	5'-TTCCAGGACCAAGATCCCTCCAAA-3'	24 nt		231	86 pb
HsGAPDH-R2 (antissenso)	5'-ATGGTGGTGAAGACACCAGTGAAC-3'	24 nt	XM_001725661	316	

T= tamanho; *Gene Bank* = Código no GenBank; Gene = Posição no gene; FA = fragmento amplificado.

4.2.6 Realização da RT-PCR em tempo real

As amostras de cDNA resultantes da RT foram submetidas à PCR em tempo real realizada no equipamento de sistema de PCR em tempo real ABI PRISM[®] 7500 *Sequence Detection System* (Laboratório de Genética Animal da Escola de Medicina Veterinária/UFMG), utilizando-se o *Power SYBR Green[®] PCR Master Mix Kit* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

As amostras foram aplicadas em placas de 96 poços (ABI PRISM[®] 96-Well *Optical Reaction Plate with Barcode*, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em triplicata, no volume final de reação de 25 μ L.

Em cada poço foram pipetados 5 μL de amostra e adicionados posteriormente 10 μL do *mix* contendo 12,5 μL do *Power SYBR Green*[®] PCR *Master Mix Kit*, 1,5 μL de cada *primer* (senso e antissenso) (1,5 pmol/cada) e o volume final completado com H_2O livre de Rnase e Dnase (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA). A placa foi selada com adesivo óptico (ABI PRISM[®] *Optical Adhesive Covers*, *Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA) e recebia um *spin* para trazer todo o volume para o fundo do poço. Em seguida, a placa era encaixada no equipamento de PCR em tempo real para dar-se início à leitura. Durante todo o processo, luvas, máscara e ponteiras com barreira eram usadas e toda a pipetação era feita em capela de fluxo para evitar-se contaminação. As reações de PCR em tempo real ocorreram no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 52°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/0,15 min. e 50°C/1 min. Ao término da ciclagem, foi realizada a curva de *melting* a 60°C por um minuto, para a construção da curva de dissociação, que tem por objetivo determinar a especificidade dos fragmentos amplificados.

O *theresold cycle* (Ct) foi usado para estimar o aporte de cDNA na reação de PCR. Uma amostra de cDNA de cada grupo foi usada para a construção de curvas de diluição, que demonstraram a linearidade entre o Ct e o logaritmo da concentração do cDNA (log cDNA).

4.2.7 Análise estatística

Para ajustar o controle interno, os resultados foram expressos como ΔCt , que é o resultado da subtração do Ct dos genes-alvo (α -inibina e betaglicano) com o Ct do gene de referência (GAPDH). A expressão gênica relativa foi calculada como *fold change*, definido pela fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, onde $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$ médio do grupo com endometriose – ΔCt médio do grupo controle. As análises foram realizadas tendo por base o ΔCt , que é a fonte primária da variação (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001.)

Os cálculos estatísticos foram feitos no programa *GraphPad Prism 5*. Os dados foram testados para normalidade e para homogeneidade das variâncias e não diferiram da curva de normalidade, por isto foram expressos como média \pm erro-padrão (SEM). O teste t de Student não pareado foi adotado para avaliar a

expressão dos genes-alvo entre os dois grupos. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$.

4.3 Imuno-histoquímica

4.3.1 Pacientes

Para a realização da imuno-histoquímica, foram obtidas amostras de endométrio eutópico de mulheres no menacme submetidas à histerectomia por doenças benignas, em fase aleatória do ciclo menstrual ($n=4$) e de mulheres em propedêutica básica de infertilidade ($n=5$), que foram submetidas a biópsia endometrial com Pipelle[®] no 18º dia do ciclo. Além disto, exemplares de endométrio eutópico e de lesões endometrióticas foram coletadas de pacientes que se submeteram a procedimento cirúrgico para diagnóstico e tratamento de endometriose com acometimento intestinal ($n=6$). A idade das pacientes variou de 26 a 45 anos e foi semelhante entre os grupos de mulheres com e sem endometriose ($35,3 \pm 2,4$ anos e $33 \pm 1,6$ anos, respectivamente, $p=0,45$). Em todos os casos o diagnóstico da doença foi confirmado por exame anatomopatológico da lesão endometriótica. Três pacientes com endometriose estavam em uso de medicação hormonal: duas faziam uso de contraceptivo oral combinado e uma era usuária de sistema intrauterino liberador de levonorgestrel.

4.3.2 Coleta e processamento das amostras

A coleta de material de pacientes com endometriose foi realizada durante procedimento cirúrgico, com extração de amostras de lesões endometrióticas intestinais e de exemplares de endométrio eutópico por aspiração intrauterina. As amostras 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 o grupo de endométrio eutópico de pacientes sem endometriose, as amostras obtidas de ressecção em peça cirúrgica foram processadas como as anteriores. As amostras obtidas por Pipelle[®] foram congeladas em nitrogênio líquido e

mantidas a -80°C . Para a confecção dos cortes histológicos, foram então descongeladas em PBS a 4°C , fixadas e incluídas em parafina.

As lâminas produzidas a partir dos blocos de parafina foram datadas por um patologista de acordo com a fase do ciclo menstrual representada histologicamente. A proporção de amostras datadas como fase proliferativa/secretora foi de 5/4 no grupo controle e de 3/2 no grupo com endometriose.

4.3.3 Realização do experimento

Os blocos de parafina foram seccionados ($5\ \mu\text{m}$ de espessura) e fixados em lâminas silanizadas. Para a imuno-histoquímica foram utilizados anticorpos policlonais de coelho contra α -inibina e betaglicano, gentilmente doados pelo Prof. Wylie Vale (Salk Institute, La Jolla, CA, USA). O anticorpo anti- α -inibina foi previamente validado e não apresenta reação cruzada significativa com outras moléculas da mesma família (VAUGHAN *et al.*, 1989). O anticorpo anti-betaglicano foi produzido contra um fragmento solúvel do domínio extracelular do betaglicano, onde se localiza o sítio de ligação da α -inibina, e sua especificidade foi confirmada em ensaios prévios (WIATER *et al.*, 2006; 2009).

As lâminas foram incubadas em estufa (56°C) por 24 horas, depois desparafinizadas, reidratadas em graus descendentes de etanol e lavadas em PBS. Em seguida, foi realizada recuperação antigênica, utilizando-se banho-maria a 97°C com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1:10.

Todas as etapas da IHQ foram cumpridas com o sistema de polímeros não biotinizados Novolink[®] (Novocastra, New Castle, Reino Unido). Inicialmente, bloqueou-se a atividade de peroxidase endógena por cinco minutos (*peroxidase block*). Depois, para reduzir a coloração de *background*, as secções foram incubadas por cinco minutos com o *protein block*. Após esses passos, os anticorpos primários, diluídos em tampão *diagnostic bio system* (DBS - The Hague, Netherlands), numa concentração de 1:1.500 (α -inibina) e 1:50 (betaglicano), foram então aplicados às lâminas, permanecendo incubados por uma hora em câmara úmida, sob temperatura ambiente. Como controle positivo, foram utilizadas lâminas de testículo. Como controle negativo, foi aplicado tampão PBS no lugar do anticorpo primário. Após a incubação com os anticorpos

primários, foi aplicado o *post primary block* por cinco minutos e depois o polímero. A revelação foi realizada com solução de diaminobenzidina (DAB). Por fim, as lâminas foram tratadas com hematoxilina de Harris e montadas com Entellan[®] (Merck, São Paulo, Brazil). Caracterizou-se como uma reação positiva a coloração acastanhada ao exame microscópico.

4.3.4 Avaliação da intensidade da coloração imuno-histoquímica

A intensidade da coloração imuno-histoquímica foi avaliada por dois observadores independentes em uma escala semiquantitativa que considerou a imunocoloração de cada amostra como ausente (0/-), fraca (1/+), moderada (2/++) ou forte (3/+++). A expressão de cada proteína foi avaliada separadamente no estroma e no epitélio glandular. Foi utilizado um microscópio Carl Zeiss SMT (Berlim, Alemanha) e as imagens foram salvas em computador através de câmara digital.

4.3.5 Análise estatística

Como a distribuição dos dados foi não paramétrica, para as variáveis contínuas os resultados foram descritos como mediana e comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. Para comparações múltiplas, foi utilizado o teste de Dunn. As variáveis categóricas (presença/ausência de imunomarcção) foram analisadas pelo teste do qui-quadrado, corrigido pela razão de verossimilhança (*likelihood ratio test*). Foram considerados significância estatística valores de $p < 0,05$. As análises foram feitas nos programas *GraphPad Prism 5.0* e *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Expressão do mRNA da α -inibina

A curva de dissociação do gene da α -inibina foi única para cada fragmento e confirma a especificidade dos fragmentos transcritos (FIG.6-A). A linearidade da reação de RT-PCR foi confirmada pela curva de diluição, obtida a partir de diluições seriadas do mRNA. (FIG. 6-B)

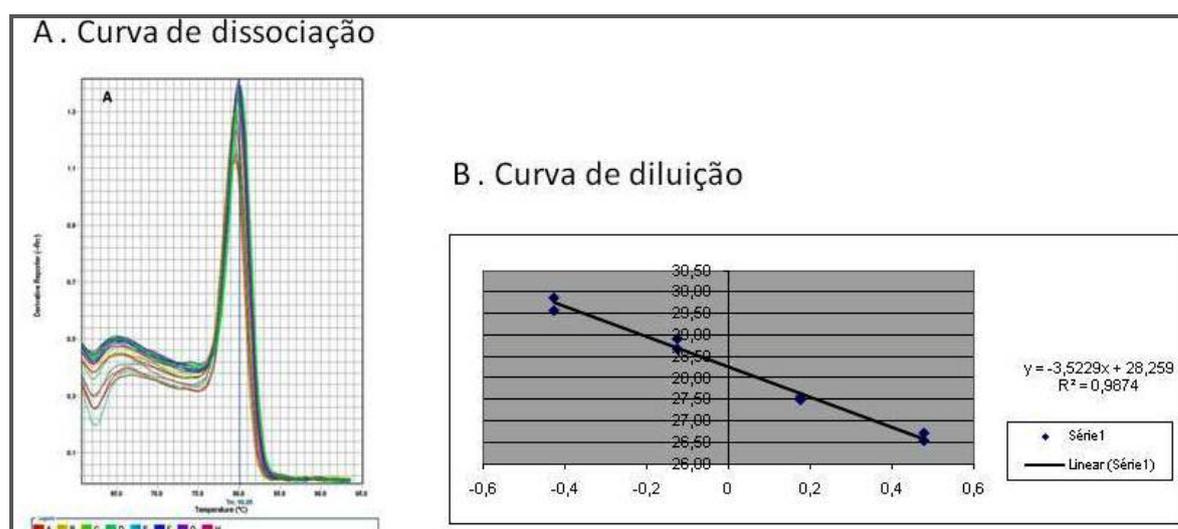


FIGURA 6 – A. Curvas de dissociação da α -inibina a 80,06°C: checagem do tamanho dos fragmentos amplificados. B. Curva de diluição da α -inibina.

Quando avaliada por RT-PCR semiquantitativo, a expressão do mRNA da α -inibina (expressada pelas relações inibina/GAPDH e betaglicano/GAPDH, respectivamente) foi muito mais significativa no endométrio eutópico das mulheres com endometriose que nos controles ($p=0,01$), com incremento de 8,6 vezes (GRÁF. 1).

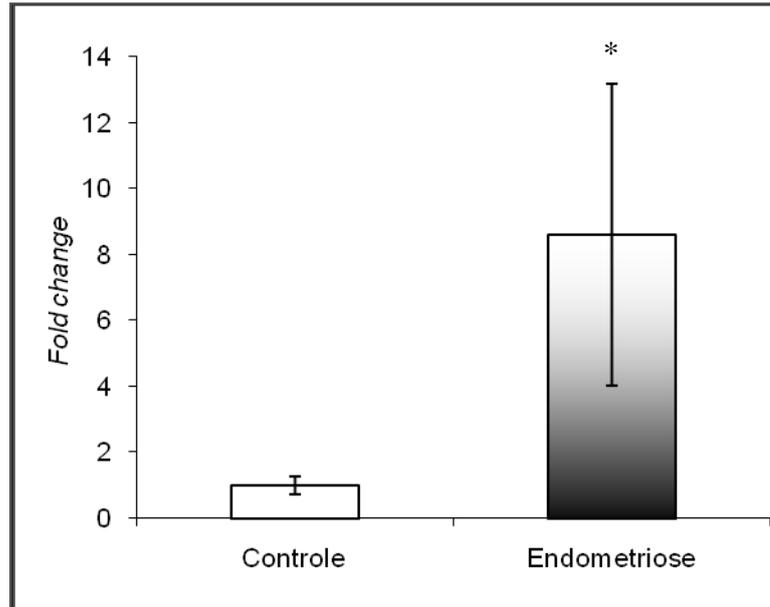


GRÁFICO 1 – Expressão do gene da α -inibina no endométrio de mulheres com e sem endometriose.

5.2 Expressão do mRNA do betaglicano

A curva de dissociação do betaglicano também foi única para cada fragmento, o que confirmou a especificidade do gene-alvo (FIG. 7-A). Múltiplas diluições seriadas permitiram a criação da curva de diluição com verificação da linearidade da reação de RT-PCR. (FIG. 7-B)

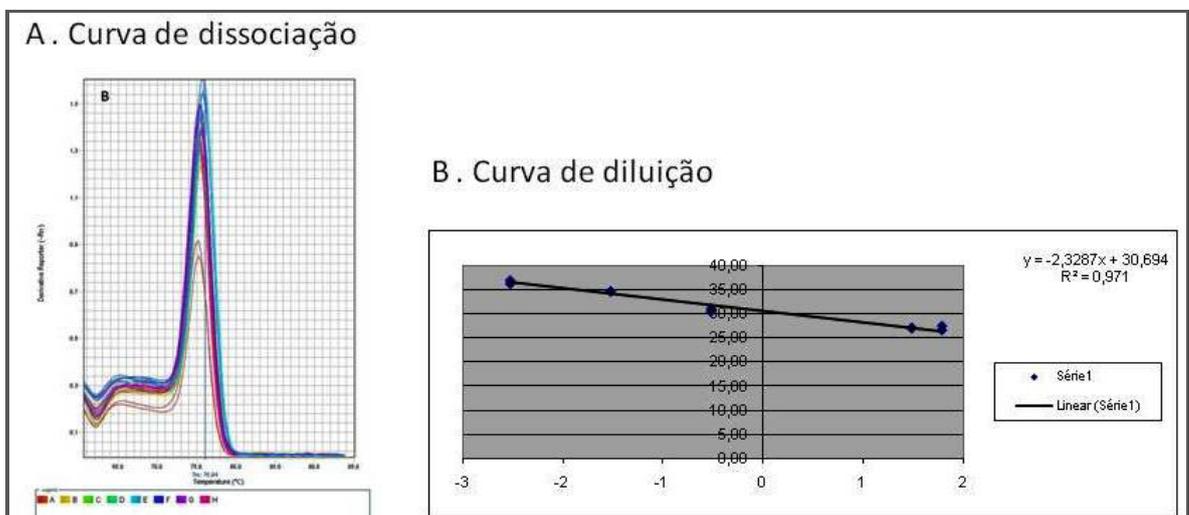


FIGURA 7 – A. Curvas de dissociação do betaglicano a 80,06 °C: checagem do tamanho dos fragmentos amplificados. B. Curva de diluição do betaglicano.

A expressão gênica do betaglicano foi 5,8 vezes mais significativa no endométrio eutópico das mulheres com endometriose que nas saudáveis ($p < 0,01$) (GRÁF. 2).

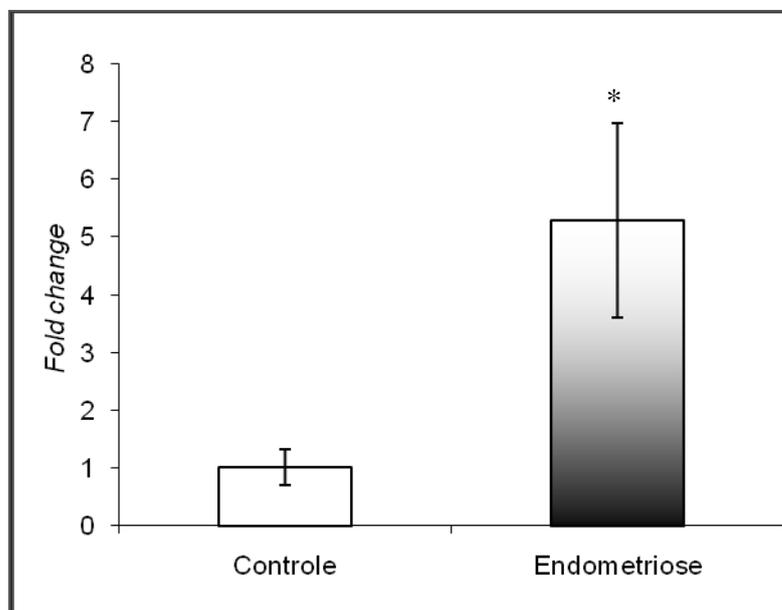


GRÁFICO 2 – Expressão do gene do betaglicano no endométrio de mulheres com e sem endometriose.

5.3 Imunolocalização da α -inibina

No endométrio eutópico, imunorreatividade para inibina foi difusamente encontrada no citoplasma das glândulas endometriais e no epitélio luminal. No estroma também foram verificadas células positivas para inibina (FIG. 8). Foi observada marcação de endotélio vascular em apenas uma lâmina no endométrio eutópico de paciente com endometriose. Células miometriais não foram marcados. Nas lesões endometrióticas, marcação glandular foi referida em apenas uma amostra, enquanto que a marcação estromal foi detectada nas duas amostras que se mostraram positivas para α -inibina (TAB. 1).

A análise da existência ou não de imunomarcacão mostrou menos amostras marcadas na lesão endometriótica do que no endométrio eutópico ($p=0,01$) (TAB. 1). Marcaçao positiva para α -inibina foi observada em 2/6

amostras de lesões endometrióticas, enquanto que no endométrio eutópico de mulheres com e sem a doença os valores encontrados foram 6/6 e 7/9, respectivamente.

A TAB. 2 exhibe a intensidade da marcação imuno-histoquímica nas amostras estudadas. Foi observada diferença significativa na imunomarcação entre o endométrio eutópico de mulheres com endometriose e as lesões endometrióticas: as amostras de tecido ectópico apresentaram menos intensidade na coloração imuno-histoquímica ($p=0,02$).

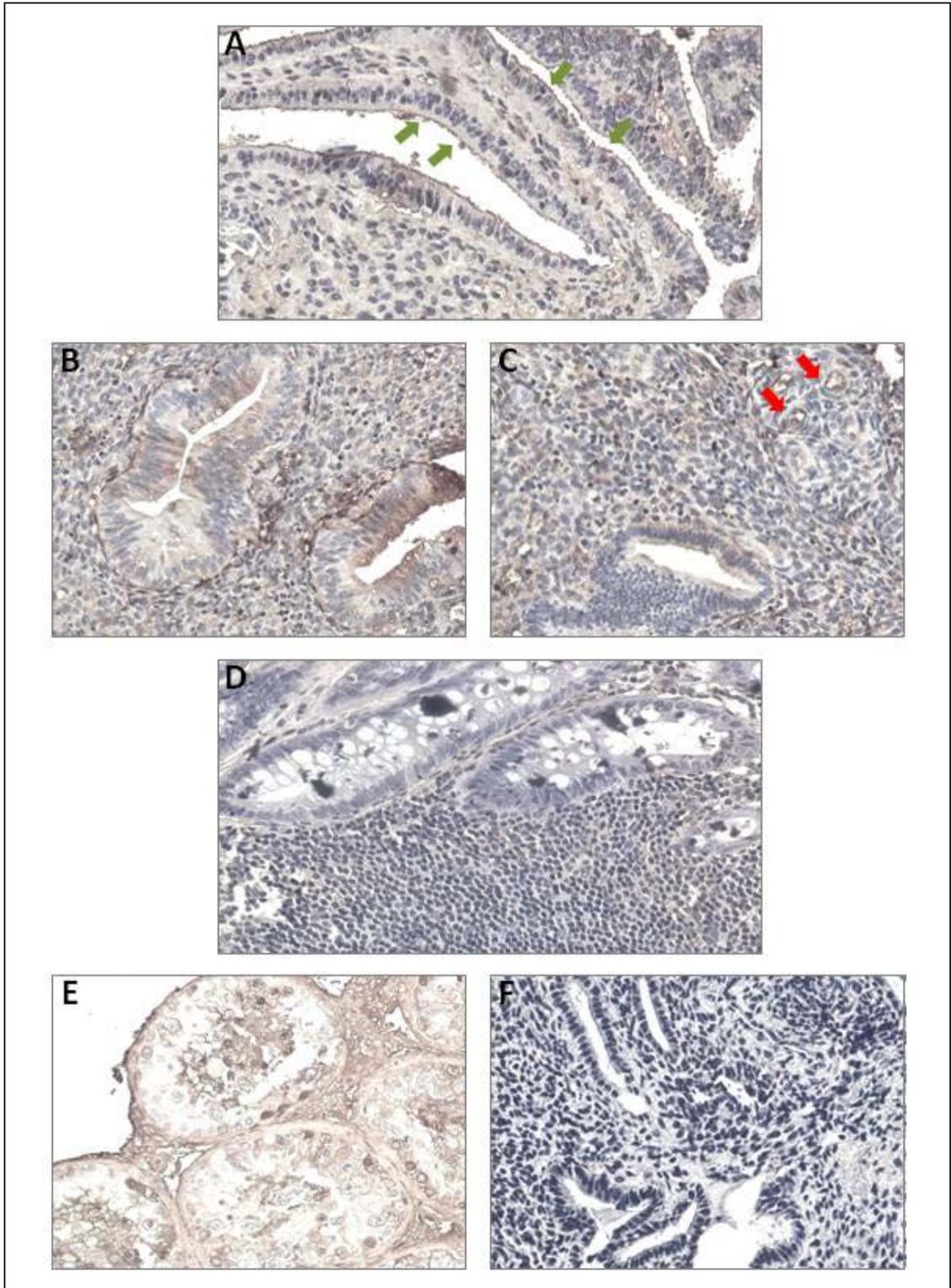


FIGURA 8 - Microscopia com aumento de 200 X para imunolocalização da α -inibina. (A) Marcação moderada em endométrio, grupo controle. As setas verdes indicam imunomarcagem do endotélio luminal glandular. (B-C) Endométrio eutópico de paciente com endometriose: marcação intensa em estroma e moderada em glândula. Setas vermelhas indicam marcação de endotélio vascular. (D) Marcação ausente em lesão endometriótica intestinal predominantemente estromal. (G) Controle positivo. (H) Controle negativo.

TABELA 1

Proporção de amostras que expressaram α -inibina e betaglicano nos três grupos estudados, de acordo com o compartimento tecidual analisado

Grupo	Endométrio sadio	Endométrio eutópico de paciente doente	Lesão endometriótica
Epitélio glandular			
α -inibina	6/9*	6/6*	1/5* ^a
Betaglicano	9/9	6/6	5/5
Estroma			
α -inibina	6/8* ^b	6/6*	2/6*
Betaglicano	8/8	6/6	6/6
Epitélio e/ou estroma			
α -inibina	7/9*	6/6*	2/6*
Betaglicano	9/9	6/6	6/6

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

^a O grupo foi menor porque uma amostra não exibiu glândulas para análise.

^b O grupo foi menor porque uma amostra não exibiu tecido estromal suficiente para análise.

TABELA 2

Avaliação da intensidade da imunocoloração da subunidade α da inibina e do betaglicano nas amostras estudadas

Grupo / compartimento tecidual	α-inibina	Betaglicano
Endométrio eutópico saudável		
Epitélio glandular	++	++
Estroma	++	++
Endométrio eutópico de mulheres com endometriose		
Epitélio glandular	++	+++
Estroma	+++	+++
Lesão endometriótica		
Epitélio glandular	+	++
Estroma	+	+

Imunocoloração nas amostras estudadas: intensidade fraca = +, moderada = ++ e forte = +++

As diferenças entre o endométrio eutópico de mulheres com endometriose e a lesão endometriótica são estatisticamente significativas, $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn).

5.4 Imunolocalização do betaglicano

A imunorreatividade para betaglicano foi demonstrada no compartimento glandular e estromal dos três grupos avaliados, com padrão citoplasmático de marcação. Também foi observada marcação no endotélio vascular do endométrio e no miométrio (FIG. 9).

Diferentemente da α -inibina, o correceptor betaglicano foi positivo em 100% das amostras estudadas, fazendo-se presente tanto nas lesões endometrióticas quanto no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e no endométrio eutópico dos controles saudáveis (TAB. 1).

A intensidade da coloração amarronzada na marcação imuno-histoquímica foi forte no endométrio eutópico de mulheres com endometriose, moderada no endométrio eutópico do grupo-controle e fraca a moderada nas lesões endometriais. Verificou-se diferença estatisticamente significativa na comparação da imunomarcação entre as amostras de endométrio eutópico de mulheres com endometriose e as lesões endometrióticas ($p < 0,01$) (TAB. 2).

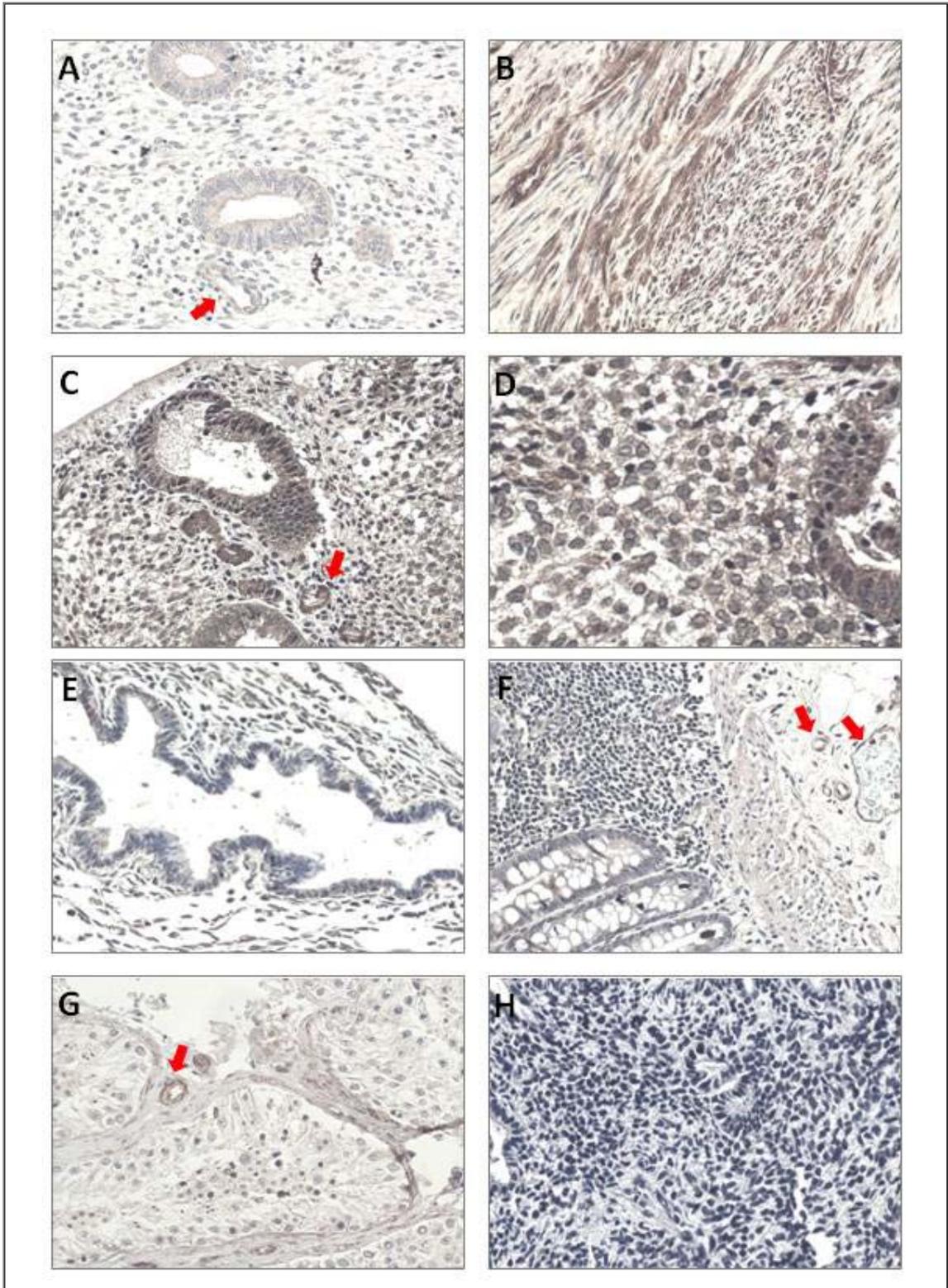


FIGURA 9 - Microscopia com aumento de 200 X para imunolocalização do betagalactano. (A) Marcação moderada em endométrio, grupo controle. (B) Marcação intensa em miométrio, grupo controle. (C) Endométrio eutópico do grupo endometriose: marcação glandular forte. Marcação fraca em lesão endometriótica intestinal glandular (E) e estromal (F). (G) Controle positivo. (H) Controle negativo. Setas vermelhas indicam marcação de endotélio vascular.

6 DISCUSSÃO

6.1 Expressão da α -inibina na endometriose

6.1.1 α -inibina no endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose

O presente estudo demonstrou a expressão proteica da subunidade α da inibina no endométrio eutópico de mulheres com endometriose, bem como no endométrio eutópico de mulheres sem endometriose e em lesões endometrióticas intestinais. Estes achados são consistentes com estudos prévios, que já haviam demonstrado, por meio de imuno-histoquímica, a α -inibina nos componentes estromais e epiteliais do endométrio eutópico (FLORIO *et al.*, 2005; LEUNG; SALAMONSEN; FINDLAY, 1998; MYLONAS *et al.*, 2004; 2006; ROMBAUTS *et al.*, 2006), em endometriomas ovarianos e na endometriose ileal (REIS *et al.*, 2001).

Este trabalho também encontrou mais expressão do mRNA da α -inibina no endométrio eutópico de mulheres com endometriose, quando comparadas com controles saudáveis. Apesar de a expressão gênica da α -inibina já ter sido relatada previamente no endométrio (OTANI *et al.*, 2001; PETRAGLIA *et al.*, 1998), nenhuma pesquisa havia evidenciado aumento da expressão do mRNA da α -inibina no endométrio de mulheres com endometriose.

Resultados semelhantes aos do presente estudo foram encontrados por Rombauts *et al.* (2006), que reportaram, a partir de imuno-histoquímica, mais expressão da α -inibina no endométrio eutópico de mulheres com endometriose mínima e leve, quando comparadas com controles saudáveis. Até o presente momento, o trabalho de Rombauts é o único que avaliou a expressão da α -inibina no endométrio eutópico de mulheres com endometriose.

A imunolocalização da inibina foi relatada anteriormente no câncer endometrial, sugerindo provável função da inibina na proliferação e crescimento das células endometriais (FLORIO *et al.*, 2005; MYLONAS *et al.*, 2004). O gene da α -inibina é considerado supressor de tumor, já que sua deficiência está

relacionada com a gênese tumoral (STENVERS; FINDLAY, 2009). Entretanto, ao mesmo tempo em que trabalhos da literatura mostram diminuição da expressão da inibina em células de câncer (FLORIO *et al.*, 2005; MYLONAS *et al.*, 2004), é descrito aumento da concentração sérica da inibina em pacientes na pós-menopausa com carcinoma ovariano (ROBERTSON *et al.*, 2007; TSIGKOU *et al.*, 2007), sugerindo que o aumento da inibina pode estar relacionado com a proliferação de células no câncer.

Em nosso ensaio não se apurou correspondência entre os resultados da RT-PCR e da imuno-histoquímica. Enquanto a RT-PCR mostrou aumento da expressão do gene da α -inibina no endométrio de mulheres com endometriose, não houve diferença significativa na imunorreatividade para α -inibina entre endométrios de mulheres com endometriose e controles. O mesmo grupo de Rombauts, que relatou mais expressão da α -inibina no endométrio eutópico de mulheres com endometriose mínima e leve, salientou que, nas mulheres com endometriose grave, a intensidade da marcação imuno-histoquímica no endométrio não era diferente do endométrio de mulheres sem endometriose (ROMBAUTS *et al.*, 2006).

Na presente pesquisa, os grupos estudados pela RT-PCR e pela imuno-histoquímica foram diferentes. No grupo da RT-PCR, todas as pacientes estavam na fase secretora, que é comprovadamente a fase com mais expressão endometrial de α -inibina (MYLONAS *et al.*, 2004). Entretanto, as mulheres estudadas através da imuno-histoquímica encontravam-se em diferentes fases do ciclo menstrual, de acordo com análise das amostras endometriais realizada por médico patologista. Apesar de a análise imuno-histoquímica das amostras desta investigação não ter contemplado possíveis diferenças na expressão da α -inibina entre as fases proliferativa e secretora, a discrepância de resultados entre a RT-PCR e a imuno-histoquímica poderia ter, ao menos em parte, relação com o fato de as amostras utilizadas na imuno-histoquímica estarem em fases diferentes do ciclo menstrual, que apresentam diferente expressão da α -inibina.

Além disto, a imunolocalização da α -inibina no endométrio é assunto bastante controverso. Quatro estudos prévios não constataram marcação imuno-histoquímica para α -inibina no endométrio (MABUCHI *et al.*, 2010; OTANI *et al.*, 2001; PRAKASH *et al.*, 2006), o que pode ser explicado por deficiência do método em si, por possível variação de expressão interindivíduos ou porque diferentes

anticorpos podem detectar diferentes porções da inibina, que podem não corresponder exatamente à sua forma ativa.

Assim como outros membros da família TGF- β , as inibinas são inicialmente sintetizadas como pré-pró-proteínas, que são dimerizadas por pontes de bissulfídio e depois clivadas para se tornarem maduras (FIG. 10). A subunidade α madura, que consiste de 133 aminoácidos C-terminais, é referida como αC , enquanto que o produto da clivagem é chamado de αN . O anticorpo anti- α -inibina usado no nosso experimento, provisionado pelo *Salk Institute of Biological Studies*, identifica fragmentos da região amino-terminal da subunidade αC , que é a porção madura da proteína. Esta, ao se ligar a uma subunidade β , forma o dímero ativo da inibina, responsável pela ligação no receptor e desencadeamento da ação celular (FIG. 10) (LEUNG; SALAMONSEN; FINDLAY, 1998).

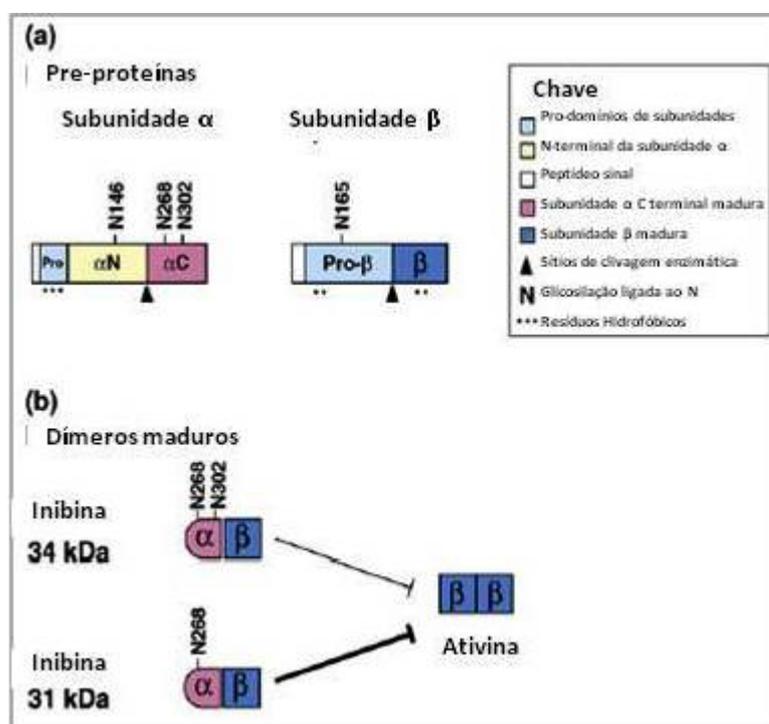


FIGURA 10 - Processamento intracelular das subunidades α e β da inibina. Fonte: Stenvers e Findlay (2009), com modificações.

Durante a tradução, dimerização e clivagem das cadeias protéicas da inibina, vários mecanismos regulatórios podem alterar a formação do hormônio maduro. Portanto, é possível que a maior transcrição gênica observada no grupo com endometriose não se acompanha de formação igualmente aumentada da

porção amino-terminal detectada pela imuno-histoquímica e, por conseguinte, da proteína biologicamente ativa.

Ressalta-se ainda que o reduzido número de amostras incluídas na análise imuno-histoquímica deste estudo pode ter conduzido a uma deficiência em confirmar os resultados da expressão gênica da RT-PCR com a expressão proteica a partir da imuno-histoquímica.

6.1.2 Inibina no endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose

A análise realizada com os tecidos obtidos de lesões endometrióticas intestinais mostrou diminuição da expressão proteica da α -inibina, numa comparação pareada com o endométrio eutópico das mesmas pacientes.

Microambiente rico em estrogênio é essencial para o implante, aderência e progressão da lesão endometriótica. A produção do estrogênio pelos tecidos reprodutivos é dependente da enzima aromatase, que não é habitualmente expressa no endométrio eutópico. Entretanto, os implantes endometrióticos expressam o gene da aromatase (MORSCH *et al.*, 2009), o que possibilita a produção local de estrogênio. Sabe-se que a expressão de inibinas e ativinas tem íntima associação com o estradiol e que doenças proliferativas endometriais estrogênio-dependentes, como hiperplasia e carcinoma, relacionam-se à diminuição da expressão da α -inibina (MYLONAS *et al.*, 2004). Como a endometriose também é uma doença dependente de estrogênio, concentração mais significativa de estrogênio ativo na lesão endometriótica em relação ao endométrio eutópico poderia alterar a expressão da α -inibina apenas localmente, no tecido ectópico, como resposta à ação parácrina do estradiol ali produzido. Isto justificaria a diminuição da expressão proteica da α -inibina no endométrio ectópico em relação ao endométrio eutópico de mulheres com endometriose, encontrada em nossas amostras.

A marcação imuno-histoquímica das lesões endometrióticas apresentou, ainda, padrão heterogêneo: apenas 1/3 das amostras foi positivo para α -inibina. Este resultado pode ter ocorrido devido à não homogeneidade dos tecidos selecionados para o estudo. A endometriose é doença crônica com padrões

histológicos diversos, podendo apresentar desde padrão estromal ou glandular bem diferenciado, com células epiteliais morfológicamente idênticas às do endométrio eutópico, até um padrão indiferenciado, que se assemelha ao mesotélio de revestimento peritoneal. Pode ser verificado, ainda, padrão histológico misto, que mescla características da morfologia diferenciada e indiferenciada na mesma lesão (DIAS JR. *et al.*, 2006). Metade das amostras avaliadas apresentava padrão histológico estromal e indiferenciado, enquanto que na outra metade o padrão era misto. Duas lâminas foram marcadas para α -inibina: uma com padrão histológico estromal indiferenciado e outra com padrão misto. Dessa forma, a não marcação para α -inibina em quatro das seis lâminas estudadas pode ser justificada pela provável variação na expressão proteica consequente da variação morfológica tecidual.

6.2 Expressão do betaglicano na endometriose

6.2.1 Betaglicano no endométrio eutópico de mulheres com e sem endometriose

O presente estudo demonstrou expressão gênica e proteica do betaglicano no endométrio eutópico e em lesões endometrióticas. Jones *et al.* (2002) foram os primeiros a demonstrar a expressão proteica do betaglicano no endométrio. Mais tarde, Florio *et al.* (2005) também detectaram, por RT-PCR e imuno-histoquímica, betaglicano no endométrio saudável e no adenocarcinoma endometrial. Até o presente momento não se tem conhecimento de estudo controlado que tenha apurado expressão do betaglicano no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e em lesões endometrióticas.

Nossos resultados mostraram que a expressão gênica do correceptor betaglicano foi mais representativa no endométrio acometido pela doença do que no controle. Entretanto, isso não foi confirmado pela análise imuno-histoquímica. Como o número de amostras no presente estudo foi reduzido, estima-se que pesquisas adicionais com número mais elevado de pacientes possam esclarecer se a alteração na expressão é um fator relacionado à gênese da endometriose,

assim como já comprovado na fisiopatologia do câncer endometrial (FLORIO *et al.*, 2005).

Este trabalho também encontrou imunomarcção para betaglicano nas células endoteliais do endométrio eutópico. Sabe-se que a ativina relaciona-se à inibição da angiogênese, provavelmente pela inibição do crescimento das células endoteliais vasculares (BREIT *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2006). Ademais, a angiogênese é um fator crucial para a sobrevivência e progressão do tecido endometrial ectópico (MACHADO *et al.*, 2010). Desta maneira, sendo o betaglicano um regulador da ação da ativina, por facilitar a ligação da inibina ao receptor de membrana, a imunolocalização do betaglicano em células endoteliais do endométrio sugere uma possível atividade regulatória na neoangiogênese endometrial.

6.2.2 Betaglicano no endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose

A intensidade da coloração imuno-histoquímica nas amostras pareadas de endométrio eutópico/ectópico de mulheres com endometriose revelou, assim como para a α -inibina, menos expressão proteica do betaglicano nas lesões endometrióticas. Isto indica que o sítio de implantação ectópica alterou significativamente a expressão do betaglicano no tecido endometrial.

A semelhança dos resultados encontrados na imunomarcção da α -inibina e do betaglicano sugere sinergismo de funções teciduais entre as duas proteínas, o que confirma a já bem documentada ação do betaglicano como um correceptor de membrana facilitador da atividade celular da inibina (LEWIS *et al.*, 2000; WIATER *et al.*, 2009).

Além de funcionar como correceptor para a inibina, o betaglicano também age como um correceptor do TGF- β , aumentando a responsividade celular ao TGF- β . O betaglicano (também chamado de TGF- β RIII) facilita a ligação do TGF- β ao receptor TGF- β RII, formando um complexo triplo: TGF- β , TGF- β RII e betaglicano. A este complexo se liga o TGF- β RI e é desencadeada uma série de reações intracelulares via proteínas Smads que irão, por fim, regular a transcrição gênica (WIATER *et al.*, 2006).

O TGF- β é um fator de crescimento sabidamente modulador da função endometrial e parece ser um provável fator envolvido na gênese da endometriose (OMWANDHO *et al.*, 2010). Enquanto a ativina promove a descamação endometrial pelo aumento da expressão das MMPs, o TGF- β é um supressor já bem estabelecido das MMPs nas células endometriais (Jones *et al.*, 2006b). E as MMPs parecem ser peça-chave para a proteólise tecidual que promove a invasão das células endometriais nos tecidos peritoneais (COLLETE *et al.*, 2006). Além disto, o TGF- β tem sido descrito como importante fator parácrino estimulador da ação da progesterona, que também é repressora da ação das MMPs (Jones *et al.*, 2006b; OMWANDHO *et al.*, 2010). Desta forma, a diminuição da expressão do betaglicano nas células endometriais ectópicas poderia causar redução da ação do TGF- β localmente. Com isto, haveria menos ação progestínica e mais ação das MMPs, o que facilitaria a invasão e a implantação das células endometriais ectópicas. Entretanto, esse mecanismo só pode ser aventado se considerarmos o implante endometriótico um tecido de origem ectópica, sem relação com o endométrio, uma vez que nossos dados mostraram aumento e não diminuição do betaglicano no endométrio eutópico das pacientes doentes.

No nosso estudo, todas as lesões endometrióticas foram positivas para o betaglicano, enquanto só 1/3 delas foi positiva para α -inibina. O correceptor betaglicano apresenta duas regiões de ligação para o TGF- β , no domínio extracelular: uma membrano-proximal e outra membrano-distal, enquanto a α -inibina tem afinidade de ligação apenas na região membrano-proximal do domínio extracelular do betaglicano. Wiater *et al.* (2006) demonstraram que certas mutações na molécula do betaglicano tornam inviável a ligação da α -inibina, mas não impedem a ligação do TGF- β . Essas mutações provocam uma falha no antagonismo da sinalização da ativina pela ligação da inibina, porém não afetam a ligação e ação celular do TGF- β (WIATER *et al.*, 2006). Desta maneira, nas amostras negativas para inibina e positivas para betaglicano avaliadas no presente trabalho, não se pode afirmar que o betaglicano esteja inativo, pois sua função poderia estar relacionada mais com a ligação do TGF- β do que com a ligação da α -inibina.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A demonstração da expressão gênica da subunidade α da inibina e de seu correceptor betaglicano no endométrio de mulheres com endometriose preconiza que a família das inibinas e ativinas exerce função na modulação local do crescimento e diferenciação celular, operando na gênese da endometriose.

O presente trabalho apurou mais expressão gênica da α -inibina e de seu correceptor betaglicano no endométrio de mulheres com endometriose. Entretanto, como estes resultados não foram confirmados pela imunohistoquímica, é ainda prematuro considerar que o aumento da expressão da α -inibina e do betaglicano seja fator determinante para a implantação do tecido endometrial fora da cavidade uterina. Uma hipótese alternativa é a de que mulheres com endometriose têm aumento na expressão da α -inibina e do betaglicano como parte do seu fenótipo, não necessariamente com implicações etiopatogênicas.

Outro achado do presente estudo é que a expressão proteica da α -inibina e do betaglicano é menos acentuada no endométrio ectópico do que no endométrio eutópico das mesmas pacientes, sugerindo que o tecido endometrial sofre modificações na expressão proteica ao migrar e se implantar como lesão endometrióide.

Em contraste com a falta de evidência para uma função sistêmica das inibinas e ativinas na endometriose, há achados da função local dessas proteínas. As células endometriais expressam os receptores ActRI, ActRII e o correceptor betaglicano (FERREIRA, 2008; FLORIO *et al.*, 2005), sendo um alvo potencial para os efeitos autócrinos das inibinas e ativinas. Ainda não foram elucidados quais são os reais efeitos das inibinas e ativinas nas células endometrióticas. Porém, assim como ocorre em outras doenças ginecológicas responsáveis a hormônios esteroides, supõe-se que inibinas e ativinas tenham função na regulação da proliferação das células ectópicas endometriais.

Estima-se que o número reduzido de amostras incluídas no presente estudo possa ter prejudicado o poder estatístico das comparações entre os

grupos avaliados. Portanto, é possível que a reprodução da mesma investigação com maior série de pacientes possa revelar outras diferenças não identificadas.

Espera-se que pesquisas futuras na linha da família TGF- β possam elucidar as questões não respondidas aqui, de maneira que seja esclarecida a real importância da inibina e do betaglicano na patogênese da endometriose.

8 CONCLUSÕES

A subunidade α de inibina e seu correceptor betaglicano são expressos no endométrio eutópico saudável, no endométrio eutópico de mulheres com endometriose e em lesões endometrióticas intestinais.

A distribuição imuno-histoquímica da α -inibina e do betaglicano é ubíqua, sendo demonstrada tanto no compartimento glandular quanto no compartimento estromal do endométrio eutópico e em lesões endometrióticas intestinais.

Miométrio e células endoteliais vasculares do endométrio apresentam imunomarcção para o correceptor betaglicano, mas não para a α -inibina.

A expressão gênica da α -inibina e do betaglicano é aumentada no endométrio eutópico de mulheres com endometriose, quando comparada com endométrio eutópico de mulheres sem a doença.

Não foi demonstrada diferença na expressão proteica da α -inibina e do betaglicano entre o endométrio eutópico saudável e o endométrio eutópico de mulheres com endometriose.

O endométrio ectópico de lesões endometrióticas intestinais apresenta menos expressão proteica de α -inibina e do betaglicano do que o endométrio eutópico das mesmas pacientes.

A demonstração gênica e proteica da α -inibina e de seu correceptor betaglicano nos endométrios eutópico e ectópico sugere possível implicação dessas moléculas na etiopatogênese da endometriose.

REFERÊNCIAS

- AKANDE, A.V. *et al.* Inhibin A, Inhibin B and Activin A in follicular fluid of infertile women with tubal damage, unexplained infertility and endometriosis. **Am J Reprod Immunol**, v. 43, p. 61–69, 2000.
- BILANDZIC, M. *et al.* Loss of betaglycan contributes to the malignant properties of human granulosa tumor cells. **Mol Endocrinol**, v. 23, n. 4, p. 539–548, Apr. 2009.
- BISCHOFF, F.; SIMPSON, J.L. Genetic basis of endometriosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1034, p. 284-99, Dec. 2004.
- BREIT, S. *et al.* The N-myc oncogene in human neuroblastoma cells: down-regulation of an angiogenesis inhibitor identified as activin A. **Cancer Res**, v. 60, n. 16, p. 4596-601, Aug. 2000.
- BULUN, S.E. Endometriosis. **N Engl J Med**, v. 360, n. 3, p. 268-79, Jan. 2009.
- CARNEIRO, M.M. *et al.* Expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in pelvic endometriosis. **Gynecol Endocrinol**, v. 23, n. 4, p. 188-92, Apr. 2007.
- CHEN, Y.G. *et al.* Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. **Exp Biol Med** (Maywood), v. 231, n. 5, p. 534-44, May, 2006.
- COBELLIS, L. *et al.* Serum inhibin A, inhibin B, and pro- α C levels are altered after surgically or pharmacologically induced menopause. **Fertil Steril**, v. 77, n. 4, Apr. 2002.
- COLLETTE, T. *et al.* Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in the eutopic endometrial tissue of women with endometriosis. **Hum Reprod**, v. 21 n. 12 p. 3059-67, Jul 31, 2006.
- DIAS JR., J.A. *et al.* **Atlas de cirurgia ginecológica: endometriose - a importância da classificação histológica.** São Paulo: PlanMark, 2006.
- DOKRAS, A. *et al.* Secretion of inhibin B during ovarian stimulation is decreased in infertile women with endometriosis. **Fertil Steril**, v. 74, n. 1, p. 35-40, 2000.
- FERREIRA, M.C.F. *et al.* Activin A increases invasiveness of endometrial cells in an in vitro model of human peritoneum. **Mol Hum Reprod**, v. 14, n. 5, pp. 301–307, 2008.
- FERREIRA, M.C.F. **Efeitos da ativina A, inibina A e folistatina sobre células endometriais em um modelo de adesão e invasão peritoneal *in vitro*.** tese de doutorado (Obstetrícia), UFMG, 2008.

FLORIO, P. *et al.* Healthy women and patients with endometriosis show high concentrations of inhibin A, inhibin B, and activin A in peritoneal fluid throughout the menstrual cycle. **Hum Reprod**, v. 13, n. 9, p. 2606-11, 1998.

FLORIO, P. *et al.* Inhibin α -subunit and the inhibin coreceptor betaglycan are downregulated in endometrial carcinoma. **Eur J Endocrinol**, v. 152, p. 277-84, 2005.

GATZA, C.E.; OH, S.Y.; BLOBE, G.C. Roles for the type III TGF- β receptor in human cancer. **Cell Signal**, v. 22, p. 1163–1174, 2010.

GAZVANI, R.; TEMPLETON, A. New considerations for the pathogenesis of endometriosis. **Int J Gynecol Obstet**, v. 76, n. Z, p. 117-125, 2002.

GIUDICE, L.C. Endometriosis. **N Eng J Med**, v. 362, n 25, p. 2389–2398, Jun. 2010.

GIUDICE, L.C.; KAO, L.C. Endometriosis. **Lancet**, v. 364, p. 1789–99, 2004.

GRAY, P.C.; BILEZIKJIAN, L.M.; VALE, W. Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan. **Mol Cell Endocrinol**, v. 188, p. 254-60, 2002.

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

HARRISON, C.Z. Modulation of activin and BMP signaling. **Mol Cell Endocrinol**, v. 225, n. 1-2, p. 19-24, Oct. 2004.

HEMPEL, N. *et al.* Loss of betaglycan expression in ovarian cancer: role in motility and invasion. **Cancer Res**, v. 67, n. 11, p. 5231-8, 2007.

HUANG, H.M.; LI, Y.C.; CHUNG, M.H. Activin A induction of erythroid differentiation through MKK6-p38 α /p38 β pathway is inhibited by follistatin. **J Cell Physiol**, v. 223, n. 3, p. 687-94, Jun. 2010.

JONES, R.L. *et al.* Activin A and inhibin A differentially regulate human uterine matrix metalloproteinases: potential interactions during decidualization and trophoblast invasion. **Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 724-32, Feb, 2006a.

JONES, R.L. *et al.* TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 217-32, Aug. 2006b.

JONES, R.L. *et al.* Expression of activin receptors, follistatin and betaglycan by human endometrial stromal cells; consistent with a role for activins during decidualization. **Mol Hum Reprod**, v. 8, n. 4, p. 8363–374, 2002.

JONES, R.L. *et al.* Inhibin and activin subunits are differentially expressed in endometrial cells and leukocytes during the menstrual cycle, in early pregnancy

and in women using progestin-only contraception. **Mol Hum Reprod**, v. 6, n. 1, p. 1107-17, Dec. 2000.

JONES, R.L.; SALAMONSEN, L.A.; FINDLAY, J.K. Activin A promotes human endometrial stromal cell decidualization in vitro. **J Clin Endocrinol Metabol**, v. 87, p. 4001–4004, 2002.

LEUNG, P.H.Y.; SALAMONSEN, L.A.; FINDLAY, J.K. Immunolocalization of inhibin and activin subunits in human endometrium across the menstrual cycle. **Hum Reprod**, v. 13, pp. 3468-3477, 1998.

LEWIS, K.A. *et al.* Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. **Nature**, v. 404, n. 6776, p. 411-4, Mar. 2000.

LICONA, P.; CHIMAL-MONROY, J.; SOLDEVILA, G. Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development. **Dev Dyn**, v. 235, n. 4, p. 1124-32, Apr. 2006.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, v 25, p. 402-8, 2001.

LUIZI, S. *et al.* Expression and secretion of activin A: possible physiological and clinical implications. **Eur J Endocrinol**, v. 145, p. 225-236, 2001.

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

MACHADO, D.E. *et al.* Higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in a rat model of peritoneal endometriosis is similar to cancer diseases. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 19, p. 29:4, Jan. 2010.

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.

MATZUK, M.M. Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. **Nature**, v. v. 360, n. 6402, p. 313-9, Nov. 1992.

McCULLAGH, D.R. Dual endocrine activity of testes. **Science**, v. 76, p. 19, 1932.

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. Epub 2009 Feb. 8, 2009.

MOTTRAM, J.C.; CRAMER, W. On the general effects of exposure to radium on metabolism and tumour growth in the rat and the special effects on the testis and pituitary. **Q J Exp Physiol Cogn Med Sci**, v. 13, p. 209–229, 1923.

MYLONAS, I. *et al.* Expression of the inhibin-alpha subunit in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue: an immunohistochemical analysis. **Gynecol Oncol**, v. 93, p. 92–97, 2004.

MYLONAS, I. *et al.* Inhibin/activin subunits beta-A (-bA) and beta-B (-bB) are differentially localized in normal, hyperplastic and malignant human endometrial tissue. **Acta Histochemical**, v. 108, p. 1-11, 2006.

MYLONAS, I. *et al.* Inhibin-alpha subunit is an independent prognostic parameter in human endometrial carcinomas: analysis of inhibin/activin-alpha, -betaA and -betaB subunits in 302 cases. **Eur J Cancer**, v. 45, n. 7, p. 1304-14, May. 2009.

OMWANDHO, C.O. *et al.* Role of TGF-betas in normal human endometrium and endometriosis. **Hum Reprod**, v. 25, n. 1, p. 101-9. Epub 2009 Nov 5, Jan. 2010.

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

OTANI, T. *et al.* Production of activin A in hyperplasia and adenocarcinoma of the human endometrium. **Gynecol Oncol**, v. 83, p. 31-8, 2001.

PETRAGLIA, F. *et al.* Expression and secretion of inhibin and activin in normal and neoplastic uterine tissues. High levels of serum activin A in women with endometrial and cervical carcinoma. **J Clin Endocrinol Metabol**, v. 83, p. 1194-200, 1998.

PETRAGLIA, F. *et al.* Inhibin and activin modulate human monocyte chemotaxis and human lymphocyte interferon-gamma production. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 72, n. 2, p. 496-502, Feb. 1991.

PRAKASH, A. *et al.* A study of luteal phase expression of inhibin, activin, and follistatin subunits in the endometrium of women with recurrent miscarriage. **Fertil Steril**, v. 86, n. 6, 2006.

REIS, F.M. *et al.* Evidence for local production of inhibin A and activin A in patients with ovarian endometriosis. **Fertil Steril**, v. 75, n. 2, p. 367-73, Feb. 2001.

ROBERTSON, D.M.; PRUYERS, E.; JOBLING, T. Inhibin as a diagnostic marker for ovarian cancer. **Cancer Lett**, v. 249, n. 1, p. 14-7, Epub 2007. Feb 2007.

ROMBAUTS, L. *et al.* Activin-A secretion is increased in the eutopic endometrium from women with endometriosis. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v. 46, n. 2, p. 148-53, 2006.

ROMBAUTS, L.; HEALY, D.L. Inhibins and activins in reproduction. **Curr Obstet Gynaecol**, v. 5, p. 155-162, 1995.

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. 1927a.

SAMPSON, J.A. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. **Am J Obstet Gynecol**, v. 14, p. 422-69. 1927b.

SAMPSON, J.A. Perforating hemorrhagic (chocolate) cysts of the ovary. **Arch Surg**, v. 3, p. 245-323, 1921.

SHARIFI, N. *et al.* TGFBR3 loss and consequences in prostate cancer. **Prostate**, v. 67, n. 3, p. 301-11, Feb. 2007.

STELLER, M.D. *et al.* Inhibin resistance is associated with aggressive tumorigenicity of ovarian cancer cells. **Mol Cancer Res**, v. 3, n. 1, p. 50-61, Jan. 2005.

STENVERS, K.L.; FINDLAY, J.K. Inhibins: from reproductive hormones to tumor suppressors. **Trends Endocrinol Metabol**, v. 21, n. 3, p. 174-180, 2009.

TAN, X.J. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 mRNA in patients with endometriosis. **Fertil Steril**, v. 78, n. 1, p. 148153, 2002.

TORRES, P.B. *et al.* Activin A, activin receptor type II, nodal, and cripto mRNA are expressed by eutopic and ectopic endometrium in women with ovarian endometriosis. **Reprod Sci**, v. 16, n. 8, p. 727-33. Epub 2009 Apr 22, Aug. 2009.

TSIGKOU, A. *et al.* Total inhibin is a potential serum marker for epithelial ovarian cancer. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 7, p. 2526-31, 2007.

TSUCHIDA, K. *et al.* Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. **Cell Commun Signal**, v. 18, n. 7, p. 15, Jun. 2009.

TURLEY, R.S. *et al.* The type III transforming growth factor-beta receptor as a novel tumor suppressor gene in prostate cancer. **Cancer Res**, v. 67, n. 3, p. 1090-8, Feb. 2007.

TU'UHEVAHA, J. *et al.* A new role for activin in endometrial repair after menses. **Endocrinology**, v. 150, p. 1904-1911, 2009.

VAUGHAN, J.M. *et al.* Detection and purification of inhibin using antisera generated against synthetic peptide fragments. **Methods Enzymol**, v. 168, p. 588-617, 1989.

VALE, W. *et al.* Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. **Nature**, v. 321, p. 6072, p. 776-9, Jun. 1986.

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.

WIATER, E. *et al.* Identification of distinct inhibin and transforming growth factor beta-binding sites on betaglycan: functional separation of betaglycan co-receptor actions. *J Biol Chem*, v 281, n. 25, p17011-22. Epub 2006 Apr 18, Jun. 2006.

WIATER, E. *et al.* Endogenous betaglycan is essential for high-potency inhibin antagonism in gonadotropes. *Mol Endocrinol*, v. 23, n. 7, p1033-42. Epub 2009 Apr 16, Jul. 2009.

YU, E.W. *et al.* Suppression of IL-6 biological activities by activin A and implications for inflammatory arthropathies. ***Clin Exp Immunol***, v. 112, n. 1, p. 126-32, 1998.

ANEXO

Anexo A – 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.


Prof.ª Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG