

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

**EXPRESSÃO DA ANGIOTENSINA-(1-7),
DO RECEPTOR Mas E DA
ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA
TIPO 2
NO ENDOMÉTRIO HUMANO**

JOÃO VAZ DA SILVA

Belo Horizonte

2008

JOÃO VAZ DA SILVA

**EXPRESSÃO DA ANGIOTENSINA-(1-7),
DO RECEPTOR Mas E DA
ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA
TIPO 2
NO ENDOMÉTRIO HUMANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher, do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, para a obtenção do título de Doutor em Medicina.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis

Belo Horizonte

2008



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Fernando Marcos dos Reis, Robson Augusto Souza dos Santos, João Lúcio dos Santos Júnior, Virgínia Mara Pereira, Ilma Simoni Brum da Silva, aprovou a defesa da tese intitulada **“EXPRESSÃO DA ANGIOTENSINA (1-7), DO RECEPTOR Mas E DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA TIPO 2 NO ENDOMÉTRIO HUMANO”** apresentada pelo doutorando **JOÃO VAZ DA SILVA** para obtenção do título de Doutor em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração em Patologia Ginecológica e Reprodução e Perinatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 11 de julho de 2008.

Prof. Fernando Marcos dos Reis
Orientador

Prof. Robson Augusto Souza dos Santos

Prof. João Lúcio dos Santos Júnior

Profa. Virgínia Mara Pereira

Profa. Ilma Simoni Brum da Silva

Dedicatória

Dedico esta tese a minha esposa Helena, e aos meus filhos Eduardo e Gustavo, pelo apoio incondicional, e pelo estímulo durante todo o tempo.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Fernando Marcos dos Reis, pesquisador arguto, de rara grandeza, agradeço por ter aceito me orientar. Devo-lhe a minha introdução em um mundo científico de alto nível. Aprendi muito. Agradeço o convívio, a amizade, a disponibilidade e as horas passadas na bancada.

À Professora Adelina Marta dos Reis, pela amizade, pelo acolhimento e por me franquear as portas do Laboratório de Endocrinologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Ao Professor Cândido C. Coimbra e Professora Umeko Marubyashi pelo estímulo e conselhos no convívio diário, o meu muito obrigado.

Ao Professor Robson Augusto Souza dos Santos, por sua contribuição intelectual, suprimento de reagentes e abertura do Laboratório de Hipertensão para a realização deste trabalho.

Ao Professor João Gilberto de Castro e Silva pelo apoio incondicional e incentivo ao meu trabalho.

Aos Professores João Lúcio dos Santos Junior e Marcos Mendonça, pelo estímulo.

Aos Professores Sérgio Veloso Brant Pinheiro e Agnaldo Lopes da Silva Filho, pela contribuição neste trabalho.

À Dra. Márcia C. Ferreira e à Profa. Márcia Mendonça Carneiro, pelo material cedido, fundamental na execução do trabalho, muito obrigado.

Aos colegas do Laboratório, Juliana Barra, Gregório e Virgínia Pereira, que me auxiliaram nos primeiros passos. Ainda colegas de bancada, Alécio, Laura, Daniele Boissu, Alex, Samuel, Fabiano, Marcivane, Michelle, Renato, e tantos outros, pelo ambiente agradável no local de trabalho.

Ao insuperável André Pimenta, químico do Laboratório de endocrinologia, Janine C. Ivo e Patrícia Mitre, sempre prontos a auxiliar.

À Elba, amiga e colaboradora, Emanuelle e Roseli, obrigado.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

RESUMO

O sistema renina-angiotensina está presente em diversos tipos de tecidos, além do sistema cardiovascular. A angiotensina-(1-7), [Ang-(1-7)] é um componente do sistema renina-angiotensina, que produz efeito vasodilatador, anti-angiogênico e anti-proliferativo em diversos órgãos. A Ang-(1-7) é produzida a partir da clivagem da Ang-II pela enzima conversora de angiotensina tipo 2 (ECA2) e atua por meio de um receptor acoplado à proteína G específico, o receptor Mas. O objetivo deste estudo foi avaliar se o endométrio humano expressa Ang-(1-7), o receptor Mas e a enzima conversora de angiotensina tipo 2 (ECA2), em diferentes fases do ciclo menstrual. Usando radioimunoensaio, Ang-(1-7) foi detectada no lavado endometrial em concentrações picomolares. Por imunofluorescência, tanto o peptídeo como seu receptor foram identificados em células endometriais cultivadas (epiteliais e estromais). Por imunistoquímica, Ang-(1-7) foi localizada no endométrio em todas as fases do ciclo menstrual, sendo mais concentrada no epitélio glandular da fase secretora intermediária e tardia, bem como no estroma da fase proliferativa. Este padrão correspondeu à expressão do mRNA para ECA2, que foi significativamente mais abundante nas células epiteliais do que nas estromais (aumento de duas vezes, $p < 0,05$) e na fase secretora em relação à fase proliferativa (aumento de 6,6 vezes, $p < 0,01$). O receptor Mas foi detectado com a mesma intensidade nas células epiteliais e estromais e não variou durante o ciclo menstrual, apesar da redução no seu mRNA nas amostras de fase secretora. Em conclusão, o peptídeo vasoativo Ang-(1-7), a enzima envolvida na sua síntese e seu receptor Mas são expressos no endométrio humano. O peptídeo Ang-(1-7) e a enzima ECA2 têm sua expressão aumentada na fase secretora do ciclo menstrual.

Palavras-chave: Endométrio. Angiotensina-(1-7). Mas. Sistema renina-angiotensina. Ciclo menstrual.

ABSTRACT

Angiotensin (Ang)-(1-7) is a newly characterized member of the renin-angiotensin system, which has vasodilatory, anti-angiogenic and anti-proliferative effects in several organs. Ang-(1-7) is produced from cleavage of Ang-II by angiotensin-converting-enzyme type 2 (ACE2), and acts through a specific G protein-coupled receptor, Mas. The aim of the present study was to investigate whether the human endometrium expresses Ang-(1-7), the receptor Mas, and the mRNA encoding ACE2 at different phases of menstrual cycle. By radioimmunoassay, Ang-(1-7) was detected in endometrial wash fluid at picomolar concentrations. Using immunofluorescence, both the peptide and its receptor were identified in cultured endometrial epithelial and stromal cells. By immunohistochemistry, Ang-(1-7) was localized in the endometrium throughout menstrual cycle, being more concentrated in the glandular epithelium of mid- and late secretory phase and in the stroma of early proliferative phase. This pattern corresponded to the ACE2 mRNA, which was significantly more abundant in epithelial cells than in stromal cells (2-fold increase, $p < 0.05$) and in the secretory vs. proliferative phase (6.6-fold increase, $p < 0.01$). The receptor Mas was equally distributed between epithelial and stromal cells and did not change during menstrual cycle. In conclusion, the vasoactive peptide Ang-(1-7), the enzyme involved in its synthesis and its receptor Mas are all expressed in the human endometrium, and the peptide is up-regulated during the secretory phase of menstrual cycle. The physiological role of this peptide system in normal and pathological endometrium warrants further investigation.

Key words: Endometrium. Angiotensin-(1-7). Mas. Renin-angiotensin system. Menstrual cycle.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AKT	Proteína Kinase B
Ang	Angiotensina
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CT	<i>Threshold cycle</i>
DAB	Diaminobenzidina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DEPE	Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão
DIU	Dispositivo intra-uterino
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ERK	Sinal extracelular de kinase
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
HC	Hospital das Clínicas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IGFBP	Proteína ligadora do fator de crescimento insulina “símile”
IRS1	Substrato para receptor de insulina 1
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>
MAPK	Proteína ativadora de mitose kinase
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PBS	Solução salina de fosfato tamponada (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PLA2	Fosfolipase A2
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto

SNC	Sistema nervoso central
SRA	Sistema renina-angiotensina
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

Figura 1 - Diagrama representando as três séries de casos incluídas no estudo, além das amostras de culturas de células de endométrio.....	36
Figura 2 - Curvas de dissociação da PCR em tempo real.....	44
Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 4% comprovando a presença de banda única nos produtos de amplificação dos genes da ECA2, do receptor Mas e da proteína ribossomal S26.....	45
Figura 4 - Curvas de amplificação da PCR em tempo real.....	46
Figura 5 - Curvas de regressão linear utilizadas para cálculo dos resultados da PCR em tempo real.....	47
Figura 6 - Localização de Ang-(1-7) no endométrio humano em diferentes fases do ciclo menstrual.....	50
Figura 7 - Imunofluorescência e microscopia confocal mostrando a localização intracelular da imunomarcacão para Ang-(1-7) em células endometriais cultivadas.....	51
Figura 8 - Expressão do mRNA para ECA2 em células endometriais cultivadas e em amostras de tecido endometrial datadas como endométrio proliferativo ou periovulatório (Prol+M) vs. secretor.....	53
Figura 9 - Localização do receptor Mas no endométrio humano em diferentes fases do ciclo menstrual.....	54
Figura 10 - Imunofluorescência e microscopia confocal mostrando a localização intracelular da imunomarcacão para Mas em células endometriais cultivadas.....	55
Figura 11 - Expressão do mRNA para o receptor Mas em células endometriais cultivadas e em amostras de tecido endometrial datadas como endométrio proliferativo ou periovulatório (Prol+M) vs. secretor.....	55
Figura 12 - Resumo esquemático da intensidade de imunocoloração	

para Ang-(1-7) e seu receptor Mas nas amostras endometriais
obtidas em diferentes fases do ciclo menstrual..... 56

Quadro

Quadro 1 - Oligonucleotídeos iniciadores usados nas reações de PCR
em tempo real..... 44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 O endométrio humano.....	16
1.1.1 Irrigação do endométrio.....	17
1.1.2 Modificações cíclicas do endométrio.....	17
1.1.3 Decidualização.....	20
1.1.4 Alterações funcionais do endométrio.....	21
1.2 O sistema renina-angiotensina (SRA).....	22
1.2.1 Angiotensina II.....	24
1.2.2 Angiotensina-(1-7).....	24
1.2.2.1 Formação da angiotensina-(1-7).....	26
1.2.2.2 Mecanismo da Ang-(1-7) na regulação da pressão arterial.....	27
1.2.2.3 Mecanismos de ação da Ang-(1-7) no nível molecular.....	27
1.2.3 A relação da ANG-(1-7) com a ANG II.....	28
1.2.4 O receptor Mas.....	28
1.3 A relação do sistema renina-angiotensina com o sistema reprodutor.....	30
1.3.1 O sistema renina-angiotensina no endométrio.....	31
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3 METODOLOGIA.....	34
3.1 Parecer ético.....	34
3.2 Sujeitos da pesquisa.....	34
3.3 Dosagem de Ang-(1-7) por radioimunoensaio.....	36
3.4 Imunoistoquímica do tecido endometrial.....	37
3.4.1 Princípios da técnica.....	37
3.4.2 Materiais utilizados.....	38

3.4.3 Seqüência do processo.....	39
3.4.4 Análise da imunoistoquímica.....	40
3.5 Avaliação da expressão gênica da ECA2 e do receptor Mas.....	40
3.5.1 Extração do RNA total.....	40
3.5.2 Quantificação do RNA extraído.....	41
3.5.3 Síntese do DNA complementar.....	41
3.5.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.....	42
3.5.5 Análise da especificidade dos produtos da PCR.....	45
3.5.6 Análise quantitativa dos resultados do PCR.....	46
3.6 Imunofluorescência e microscopia confocal.....	48
3.7 Análise estatística.....	48
4 RESULTADOS.....	49
4.1 Detecção de Ang-(1-7) imunorreativa no lavado endometrial.....	49
4.2 Localização da Ang-(1-7) no endométrio.....	49
4.3 Expressão da enzima conversora de angiotensina tipo 2 no endométrio.....	51
4.4 Localização do receptor Mas no endométrio.....	51
4.5 Expressão do mRNA do receptor Mas nas células epiteliais e estromais do endométrio.....	52
4.6 Resumo dos achados de imunolocalização da Ang-(1-7) e Mas no endométrio humano.....	56
5 DISCUSSÃO.....	57
6 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXO	76

1 INTRODUÇÃO

O estudo da célula e do seu metabolismo sempre foi um desafio aos pesquisadores devido, em parte, ao tamanho desta estrutura e, em contraste, à variada gama de substâncias presentes no seu interior. Outro aspecto que também dificulta a investigação é a especialização das células, também bastante diversificada. Foram necessários métodos e técnicas apropriados, desenvolvidos ao longo do tempo, para vencer os obstáculos impostos.

As células apresentam, ainda, diferentes reações frente a diversos estímulos do próprio organismo e do meio exterior, o que aumenta as variáveis a serem consideradas nos estudos. Por vezes, uma mesma substância produz determinado estímulo em um tipo de célula e, em outro tipo celular, o efeito será o inverso. Como exemplo disso, tem-se a prostaglandina E_1 , que pode tanto inibir a adenosina monofosfato cíclico (AMPC) quanto estimular a sua ação, em tipos celulares distintos. Isto se deve a diferentes tipos de proteínas acopladas ao receptor, que comutam o efeito de um mesmo estímulo (LEHNINGER, 2002).

Outras funções celulares no organismo são tão importantes para a vida, que há mais de um efector responsável por ela, o que aumenta a segurança na execução. A seleção natural se encarregou disto. Um exemplo é o estímulo para clivar o glicogênio, em que várias substâncias como a adrenalina, o glucagon e o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) podem desempenhar este estímulo (LODISH *et al.*, 2005). Outra situação encontrada é uma mesma proteína exercendo sua função em substratos diferentes; fato não raro, como a enzima conversora de angiotensina (ECA), que produz a angiotensina II (Ang II) e também degrada a bradicinina (ERDÖS, 1990; FERRARIO, 2003).

Geralmente, um tecido típico é constituído de um mesmo tipo celular, como o tecido muscular, mas outros são mais complexos e apresentam mais de uma espécie celular na sua composição. O endométrio humano é um exemplo, sendo constituído de células epiteliais na sua superfície, que se invaginam na profundidade tecidual, formando o lúmen glandular. As células do epitélio superficial não apresentam as mesmas modificações cíclicas do epitélio glandular, apesar de aparentemente serem o mesmo tipo celular (HALBE, 1993). Abaixo

dessa camada epitelial encontra-se um conjunto celular estromal bem distinto do epitélio superficial, apresentando morfologia celular que se modifica durante o ciclo menstrual. Esse tecido também apresenta alterações vasculares e, em determinada época do ciclo menstrual, ocorre infiltração leucocitária, com predomínio de mononucleares, que são também participantes ativos do metabolismo tecidual (JABBOUR *et al.*, 2005). Trata-se de um tecido heterogêneo e dinâmico, com intenso metabolismo relacionado ao crescimento celular, mecanismo de apoptose, angiogênese, secreção glandular e mecanismo de controle imunológico. Para tanto, existe intensa produção de fatores de crescimento, como fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), prostaglandinas, prolactina, interleucinas, óxido nítrico e peptídeos do sistema renina-angiotensina (SRA). Diz-se que o endométrio é um dos tecidos mais complexos do organismo (SPEROFF; FRITZ, 2005). Compreender e estudar essas substâncias autócrinas e parácrinas é de suma importância para elucidar funções relacionadas com a reprodução e controle do crescimento celular ou compreender melhor o controle do fluxo sanguíneo menstrual.

Por isto, frente à profusão de substâncias parácrinas, a progressão do conhecimento relacionado ao metabolismo celular, nos diversos tipos de tecido, se faz de maneira lenta e gradual, pela agregação de novos achados, de pequenas descobertas, por vezes desprovidas de utilidade imediata. Esses novos conhecimentos constituem as unidades, os tijolos que constroem o entendimento de algo maior.

O sistema renina-angiotensina vem evoluindo desta maneira, gradativamente, há mais de um século. Com a aglutinação de novas descobertas, suas funções foram ampliadas, tornando-se então um sistema mais complexo, ocorrendo, inclusive, mudanças conceituais.

Esse sistema foi caracterizado no passado como substâncias localizadas nos rins, que agiriam na pressão do sangue (GASPARO *et al.*, 2000). Posteriormente, passou a ser compreendido como um conjunto de substâncias presentes na circulação, algumas das quais atuavam em sítios distantes do local onde foram produzidas (CAMPBELL, 1987).

Um fator importante que veio auxiliar e ampliou o conhecimento do SRA foi o aparecimento e aprimoramento, nas últimas três décadas, dos métodos de

biologia molecular e de análise da expressão gênica, tendo permitido o estudo e detecção da expressão de proteínas, em determinado momento, na célula (LI *et al.*, 2000; SOUBRIER; CORVOL, 2000). Isto acrescentou novos dados e propiciou uma ampliação conceitual, confirmando, então, ações autócrinas e parácrinas, em diversos tecidos e órgãos, não relacionadas ao controle da pressão arterial e ao equilíbrio hidroeletrolítico (HUSAIN *et al.*, 1983), sugerindo outras ações, seja na função da célula madura ou no processo da diferenciação celular (GASPARO *et al.*, 2000).

1.1 O endométrio humano

O endométrio é um tecido responsivo a hormônios esteróides e a fatores autócrinos e parácrinos e apresenta modificações morfológicas e funcionais em um período de tempo relativamente curto, que compreende o ciclo menstrual. As alterações morfológicas apresentam sincronismo com o ciclo menstrual, permitindo a compreensão parcial da fisiologia, a partir da avaliação específica dos componentes vasculares, glandulares e estromais desse tecido (GLASSER *et al.*, 2000; NOYES; HERTIG; ROCK, 1950).

O endométrio origina-se, embriologicamente, durante a fusão dos ductos de Müller, a partir da 10ª semana de gestação, com o início da formação do útero; e completa sua embriogênese na 20ª semana da gravidez. O epitélio que reveste internamente a cavidade dos ductos *müllerianos* dará origem ao epitélio endometrial e o mesênquima adjacente a este epitélio dará origem ao estroma (GLASSER *et al.*, 2000; SPEROFF; FRITZ, 2005).

Morfologicamente, o endométrio apresenta na superfície um epitélio simples, cúbico, que reveste toda a cavidade uterina, com algumas células ciliadas que se concentram em maior número perto dos orifícios glandulares e são raras dentro do lúmen glandular, aumentando em número sob estímulo estrogênico. Apesar do revestimento da cavidade uterina ser constituído do mesmo epitélio que reveste as glândulas, funcionalmente não mostra as mesmas transformações cíclicas do epitélio glandular (HALBE, 1993).

Abaixo do epitélio superficial aparece o estroma endometrial. É constituído principalmente por células pequenas e fusiformes, com escasso

citoplasma, e fibras colágenas entremeadas, no início do ciclo menstrual. Com o evoluir do ciclo, essas células apresentam aumento do tamanho e os núcleos se tornam mais redondos. A região superficial do estroma é intensamente reativa aos hormônios esteróides e no final do ciclo menstrual é conhecida como camada compacta. Nessa região está localizado o colo das glândulas, com estrutura mais retilínea do que o corpo glandular, que aparece em região mais profunda.

A região média do estroma, também conhecida como camada esponjosa, apresenta a maior concentração de glândulas endometriais, sendo este epitélio glandular muito reativo, também, aos hormônios esteróides, com alterações morfológicas marcantes durante o ciclo menstrual.

Na região profunda do estroma, ou camada basal, aparecem algumas glândulas que apresentam pouca alteração morfológica durante o ciclo menstrual, funcionando como região tecidual permanente, como reserva, contribuindo para a regeneração do tecido durante o período menstrual (HALBE, 1993).

1.1.1 Irrigação do endométrio

No local em que a artéria radial deixa o miométrio e penetra no endométrio, ela se bifurca, dando origem a um ramo curto que irá nutrir a camada basal do tecido endometrial (arteríola basal). A jusante da bifurcação, o vaso passa a uma forma helicoidal e percorre toda a espessura do endométrio, ramificando em capilares que se anastomosam com outros capilares e vênulas. Essas artérias espiraladas são sensíveis aos estímulos hormonais e são encontradas exclusivamente em primatas (HALBE, 1993).

1.1.2 Modificações cíclicas do endométrio

A) Endométrio menstrual

Em um ciclo idealizado de 28 dias, durante o primeiro dia observa-se retração do tecido endometrial, com formação de áreas hemorrágicas subepiteliais e infiltração leucocitária. No segundo dia, já se pode verificar

desorganização tecidual ampla, exibindo focos de necrose com grandes áreas do tecido, sofrendo clivagem na junção da camada esponjosa com a camada basal e amplas áreas hemorrágicas. O terceiro dia já apresenta um início de regeneração tecidual nos cotos glandulares remanescentes da camada basal. Com a cessação do fluxo menstrual, geralmente todo o epitélio que reveste a cavidade uterina se encontra reconstituído (GLASSER *et al.*, 2000; JABBOUR *et al.*, 2005).

B) Fase proliferativa

Após o fluxo menstrual, o endométrio é fino, medindo, em média, 1 mm de espessura (HALBE, 1993). À microscopia eletrônica, as células apresentam vários ribossomos e pouco retículo endoplasmático, com aumento gradativo dos corpúsculos de Golgi e aumento no tamanho das mitocôndrias (LUDWIG; SPORNITZ, 1991).

A fase proliferativa inicial é marcada pelo aumento do número de mitoses, aumento do ácido desoxirribonucléico (DNA) e do ácido ribonucléico (RNA) citoplasmático, refletindo mais um metabolismo de crescimento celular (GLASSER *et al.*, 2000).

Histologicamente, à microscopia ótica, a fase proliferativa inicial é caracterizada por um tecido endometrial fino, variando entre 0,5 e 2 mm de espessura. Apresenta glândulas retilíneas, com diâmetro luminal estreito, formadas por epitélio colunar baixo e núcleos redondos situados na base das células (NOYES; HERTIG; ROCK, 1950).

Na fase proliferativa média, o endométrio tem espessura que atinge 5 mm, às expensas do crescimento celular e de um edema discreto e transitório no estroma. As mitoses são freqüentes e as células ciliadas aumentam em número (LUDWIG; SPORNITZ, 1991; NOYES; HERTIG; ROCK, 1950). O epitélio glandular aparece como colunar alto, as glândulas se tornam um pouco mais tortuosas, originando o fenômeno da pseudo-estratificação (SPEROFF; FRITZ, 2005).

A fase proliferativa avançada mostra glândulas longas, diminuição das mitoses e expressão máxima da pseudo-estratificação acompanhada da diminuição do edema estromal (NOYES; HERTIG; ROCK, 1950)

C) Fase secretora

Após a proliferação, o endométrio estabiliza-se numa espessura média de 6 mm, proporcionado, em parte, pela diminuição dos níveis plasmáticos do estrogênio e sob o efeito da progesterona (GRAHAM; CLARKE, 1997). Considera-se que a progesterona produz esse resultado por inibição parcial sobre os receptores de estrogênio (CLARKE; SUTHERLAND, 1990; OKULICZ; BALSAMO; TAST, 1993). O endométrio secretor, diferentemente do proliferativo, tem modificações gradativas e nítidas, com constância cronológica, o que possibilita a datação das amostras obtidas desse tecido. As modificações nos primeiros sete dias da fase secretora ocorrem principalmente no epitélio glandular e, na última semana do ciclo, preponderam as modificações no estroma endometrial (NOYES; HERTIG; ROCK, 1950; SPEROFF; FRITZ, 2005).

Histologicamente, a fase secretora do endométrio inicia-se com o aparecimento de vacúolos entre os núcleos e a base das células no epitélio glandular, aproximadamente 48 horas (16° dia do ciclo) após a ovulação, apesar da microscopia eletrônica perceber o fenômeno com mais antecedência (LUDWIG; SPORNITZ, 1991). Nota-se também pseudo-estratificação no epitélio glandular e mitoses. Com o aumento do número de vacúolos nas células glandulares, os núcleos se posicionam no centro das células, de maneira simétrica, com o citoplasma acima e os vacúolos abaixo dos núcleos, desaparecendo a pseudo-estratificação. As mitoses nas células glandulares e estromais estão presentes. Com o evoluir do ciclo, os vacúolos passam a ser encontrados abaixo e também acima dos núcleos e estes têm agora alinhamento mais homogêneo no centro das células. Já se observa formação de vesículas secretoras na borda luminal e as mitoses se tornam raras. Ocorre, então, diminuição no número de vacúolos e verifica-se secreção aumentada no lúmen glandular. Não se percebem mais, então, as mitoses nem a pseudo-estratificação.

No 20° dia do ciclo, o lúmen glandular passa a exibir grande quantidade de secreção e a borda das células do epitélio glandular se mostra anfractuosa. Não se notam mais vacúolos subnucleares, permanecendo alguns, ainda, acima dos núcleos.

Com o aparecimento súbito de edema estromal, a secreção se torna abundante no lúmen glandular. Aparecem também núcleos nus no estroma. O

edema estromal se torna acentuado. As mitoses estromais são raras (FERENCZY, 1976; NOYES; HERTIG; ROCK, 1950).

As arteríolas espiraladas aparecem proeminentes, com a bainha periarteriolar aumentada de volume e com células estromais circundantes, já com aumento do citoplasma e do núcleo e com formato mais poliédrico. As glândulas estão exauridas e as células glandulares se mostram de formato cilíndrico, baixo. As células pré-decíduais se tornam mais definidas e se colocam em torno das arteríolas. Mitoses estromais se tornam mais freqüentes.

No 25° dia do ciclo menstrual, ocorre o início de infiltração do estroma por polimorfonucleares e linfócitos; a secreção no lúmen glandular se torna mais espessa. No evoluir dos dias, as células pré-decíduais, na camada superficial do estroma, se justapõem, assumindo o aspecto de camada compacta. Todo o estroma apresenta reação pré-decidual focal. O tecido endometrial passa a ter intensa infiltração linfocitária. Aparecem áreas de necrose e hemorragia, com infiltração polimorfonuclear significativa. O estroma se retrai e inicia-se a fragmentação das glândulas (NOYES; HERTIG; ROCK, 1950).

1.1.3 Decidualização

Após a ovulação, a progesterona impõe mudanças importantes ao endométrio, preparando o ambiente tissular para a implantação do embrião. No intervalo de tempo propício à nidação, surge na membrana apical das células epiteliais projeções denominadas pinópodos, estruturas que parecem ter importância na implantação do embrião (NARDO *et al.*, 2002). Isto parece ter relação com as mudanças encontradas na expressão das proteínas do citoesqueleto, como a actina, α -actina, plectina e placoglobina. Também nesse período o endométrio se mostra receptivo ao embrião (PNG; MURPHY, 2002).

O contínuo estímulo progesterônico somado ao novo estímulo da gonadotrofina coriônica humana (hCG) faz com que as células epiteliais formem placas (FAZLEABAS; STRAKOVA, 2002; SRISUPARP; STRAKOVA; FAZLEABAS, 2001). As células estromais da camada superficial aumentam de volume, tornam-se poliédricas, como um conjunto que faz lembrar um mosaico. Contribui para essa aparência o aumento da deposição de laminina entre as

células (GLASSER *et al.*, 2000). A camada média do estroma exhibe um padrão hipertrófico, no qual as glândulas assumem aspecto rendilhado complexo. A camada basal tem contraste ainda maior em relação às camadas superiores, com as extremidades das glândulas revestidas por um epitélio não secretor, bastante diferente da região superior da glândula (GLASSER *et al.*, 2000; SPEROFF; FRITZ, 2005). No infiltrado de leucócitos, sobressaem-se os linfócitos grandes e com aspecto granular (ENDERS, 1991). Esse duplo estímulo hormonal ativa a expressão de α -actina de músculo liso nas células estromais e a expressão de glicodelina nas células glandulares (FAZLEABAS *et al.*, 1999; SRISUPARP; STRAKOVAS; FAZLEABAS, 2001). O endométrio decidualizado aumenta a expressão da proteína ligadora do fator de crescimento insulina "símile" (IGFBP-1), sendo esta proteína sugerida como um marcador de decidualização em primatas (STRAKOVA; SRISUPARP; FAZLEABAS, 2002).

A decídua, ao longo da gravidez, secreta os seus produtos no sangue materno e também exporta produtos para o líquido amniótico após o primeiro trimestre da gestação (GLASSER *et al.*, 2000).

1.1.4 Alterações funcionais do endométrio

Durante o ciclo menstrual, juntamente com as modificações morfológicas, o endométrio apresenta alterações nas funções celulares como a produção de enzimas, hormônios, citocinas, fatores de crescimento e peptídeos, devido, em parte, à expressão gênica modulada pelos hormônios esteróides.

O endométrio é um tecido extremamente sensível ao estrogênio. Este esteróide produz neste tecido, com extrema rapidez, notáveis modificações celulares morfológicas e funcionais. O estrogênio penetra a membrana celular e chega ao núcleo, onde se liga ao receptor (KING; GREENE, 1984; MYLONAS *et al.*, 2004). Esses receptores de estrogênio estão associados a proteínas nucleares. A ligação do hormônio ao receptor induz a uma modificação na sua conformação, produzindo sua dissociação das proteínas nucleares, tornando ativo o complexo estrogênio-receptor.

O estrogênio produz variada gama de efeitos, dependendo do tipo celular em que estiver atuando, sendo o efeito mitogênico um dos mais

característicos, principalmente no endométrio, durante a fase proliferativa, quando esse efeito marcante se apresenta de maneira rápida e intensa (GOODMAN; GILMAN, 1991; SPEROFF; FRITZ, 2005).

A progesterona atua no endométrio, onde é responsável por modificações estruturais e funcionais, objetivando a implantação do embrião. O receptor de progesterona localiza-se no núcleo da célula (PRESS; GREENE, 1988) e, quando ativo, apresenta-se como um dímero que se liga a elementos responsivos de determinados genes, produzindo um controle na transcrição (KIRKLAND; MURTHY; STANCEL, 1992; MYLONAS *et al.*, 2004). Um dos principais efeitos da progesterona no endométrio é a inibição da proliferação celular induzida pelo estrogênio. Esse efeito é conseguido a partir da inibição parcial da expressão do receptor estrogênico (HSUEH; PECK; CLARK, 1976) e da estimulação da 17 β -hidroxesteróide desidrogenase e sulfotransferase, que convertem o 17 β -estradiol em sulfato de estrona, um estrogênio menos potente excretado pela célula (BENEDETTO; TABANELLI; GURPIDE, 1990; TSENG; GURPIDE, 1975; ZHU; CONNEY, 1998). A progesterona também apresenta outros efeitos pronunciados no endométrio, relacionados ao mecanismo de secreção, ao metabolismo do glicogênio, à ativação e inibição de genes, o que mantém o endométrio estável durante a fase lútea (GLASSER *et al.*, 2000).

1.2 O sistema renina-angiotensina (SRA)

Tiegerstedt e Bergman (1898) relataram que o extrato salino de rim de coelho apresentava um princípio pressórico ao qual denominaram renina (GOODMAN; GILMAN, 1991; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006; TIGERSTEDT; BERGMAN, 1898). Em 1940, o grupo argentino liderado por Braum-Menendez *et al.* (1940) e, independentemente, Page e Helmer (1940) na Clínica Cleveland publicaram que a renina atuava sobre um substrato protéico plasmático, gerando o verdadeiro princípio pressor, um peptídeo que os primeiros denominaram hipertensina e o segundo grupo denominou angiotonina. Posteriormente, ficou acordado que o peptídeo seria denominado angiotensina.

Na década de 50, foram identificadas duas formas de angiotensina, sendo a primeira um decapeptídeo, a angiotensina I (Ang I), e a segunda um

octapeptideo, a angiotensina II (Ang II), derivadas da extremidade N-terminal do angiotensinogênio. A conversão da primeira na segunda ocorre pela atuação de uma enzima denominada “enzima conversora de angiotensina” (ECA), que produz a clivagem entre as posições oito e nove na Ang I. O octapeptideo assim produzido é a forma mais ativa, manifestando potente efeito pressor e está envolvido no mecanismo de liberação da aldosterona (EHLERS; RIORDAN, 1989; GOODMAN; GILMAN, 1991).

Na década de 60, foi detectado que um fator presente no veneno de serpentes do gênero *Bothrops* inibe uma enzima que degrada a bradicinina, um potente vasodilatador (FERREIRA, 1965) e que, posteriormente, confirmou-se ser esta enzima a mesma que converte a Ang I em Ang II (ERDÖS, 1990), ou seja, a ECA, o que interligou os sistemas renina-angiotensina e o sistema cininacalicroína. A ECA é uma dipeptidilcarboxipeptidase que atua sobre diversos substratos protéicos, removendo os dois últimos aminoácidos do flanco carboxílico, desde que o penúltimo aminoácido não seja a prolina, o que, portanto, impede a sua ação sobre a própria Ang II (GOODMAN; GILMAN, 1991). O conhecimento sobre esta enzima proporcionou o aparecimento de potentes drogas hipotensoras, genericamente chamadas de inibidores da ECA (TRASK; FERRARIO, 2007).

Outras enzimas atuam sobre os substratos protéicos do SRA, como as endopeptidases, as aminopeptidases, a tonina e a catepsina, sempre diminuindo, por clivagem, o comprimento das cadeias protéicas (JACKMAN *et al.*, 2002; TRASK; FERRARIO, 2007).

A percepção de que outros órgãos além do rim e do endotélio vascular expressavam angiotensinogênio (CAMPBELL; HABENER, 1986), renina (FERRIS; GORDEN; MULROW, 1967), Ang I, Ang II e ECA (PANDEY; MISONO; INAGAMI, 1984) incentivou e orientou a pesquisa em outras direções. Assim, notou-se que a depleção de sódio em ratos aumentava a expressão da renina tecidual no rim, coração e adrenal, mas não nas glândulas submandibulares (DZAU *et al.*, 1987a). Outras evidências surgiram com a demonstração de que, durante a prenhez de coelhas, a renina plasmática diminui enquanto que a renina uterina aumenta (DZAU *et al.*, 1987b). Esta independência entre o SRA circulatório e tecidual foi lentamente se consolidando e ampliou as funções deste sistema.

No ano 2000, foi identificada uma nova enzima, a “enzima conversora da angiotensina tipo 2” - ECA2 (DONOGHUE *et al.*, 2000; TIPNIS *et al.*, 2000), que não é bloqueada pelos inibidores da ECA e que remove apenas um aminoácido do substrato protéico na extremidade carboxílica, transformando a Ang I em Ang-(1-9) e removendo também o último resíduo da Ang II, produzindo a Ang-(1-7) (DONOGHUE *et al.*, 2000; VICKERS *et al.*, 2002).

1.2.1 Angiotensina II

A Ang II, o membro mais estudado do SRA, é um octapeptídeo que apresenta potente efeito vasoconstritor, promove apoptose, angiogênese e proliferação celular em diversos tipos celulares (BAKER; ACETO, 1990; DAEMEN *et al.*, 1991; DIMMELER *et al.*, 1997; GOLDENBERG *et al.*, 2001; GRIENGLING *et al.*, 1997). É formada pela ação da ECA sobre a Ang I, com remoção de dois aminoácidos do flanco carboxílico. Atua através de dois receptores situados na membrana celular, o AT1 e o AT2, acoplados à proteína G, sendo que a maioria das ações conhecidas se produz por meio do receptor AT1 (BERRY *et al.*, 2001; VINSON *et al.*, 1997).

1.2.2 A angiotensina-(1-7)

A Ang-(1-7) é um peptídeo constituído por sete aminoácidos. Acreditava-se, a princípio, que se tratava apenas de um metabólito inativo da Ang II, como demonstrado em preparações de cérebro de rato, em que a Ang II era rapidamente metabolizada em pH=7,4 em Ang-(2-8); e em pH=5,4 era gerado somente um fragmento, caracterizado como Ang-(1-7) (FITZSIMONS *et al.*, 1971; TONNAER *et al.*, 1983). Mas a demonstração de que, em homogenados de cérebro canino, a Ang I, ao ser metabolizada, tinha como principal metabólito o heptapeptídeo, encorajou novas pesquisas para melhor compreensão (SANTOS *et al.*, 1988).

Experimentos utilizando Ang-(1-7) revelaram que este peptídeo era capaz de produzir a liberação de vasopressina em cérebro canino (SCHIAVONE

et al., 1988). Tal foi a importância dada a este fato, que o líder do grupo de pesquisadores da Clínica Cleveland afirmou que se deveria reavaliar os conceitos vigentes em relação aos fragmentos de angiotensina, que até então se acreditava serem desprovidos de atividade biológica (FERRARIO, 2006; FERRARIO *et al.*, 1988).

Logo, ensaio com imunistoquímica demonstrou que a Ang-(1-7), em cérebro de rato, se expressava nas áreas paraventriculares, supra-ótica, supraquiasmática, substância inominada, eminência mediana e neuro-hipófise. Devido à ampla distribuição cerebral e ao fato da Ang-(1-7) liberar vasopressina, foi sugerido que este heptapeptídeo poderia funcionar como um neuromodulador (BLOCK *et al.*, 1988).

Nesta linha, para avaliar ações da Ang-(1-7), o peptídeo foi injetado na medula dorsal de ratos anestesiados e no núcleo do trato solitário e os animais apresentaram hipotensão. Isso também foi observado com a injeção do peptídeo no núcleo dorsal motor do nervo vago (CAMPAGNHOLE-SANTOS *et al.*, 1989). Esta ação produzida com a Ang-(1-7) era algo novo, inesperado, pois a função primordial do SRA era atuar no tônus arteriolar, elevando a pressão arterial, e liberar aldosterona.

Sendo a Ang II um peptídeo vasopressor, surgiu, então, outro peptídeo no sistema renina-angiotensina, com efeito antagônico, produzindo hipotensão.

Experimento utilizando cromatografia líquida de alta performance extraiu angiotensinas do cérebro, glândula supra-renal e plasma de ratos, registrando, pela primeira vez, a presença da Ang-(1-7) em nível central e periférico. Sugeriu-se, assim, que a Ang-(1-7) poderia representar um novo membro ativo e não mais um metabólito do SRA (CHAPPELL *et al.*, 1989). Ensaio utilizando um inibidor da ECA, portanto, inibindo a conversão da Ang I em Ang II, preconizaram que a Ang-(1-7) poderia ser formada diretamente a partir da Ang I (KOHARA; BROSNIHAN; FERRARIO, 1993).

Tendo a Ang-(1-7) apresentado efeito hipotensor após infusão em áreas do cérebro, as pesquisas orientaram-se para o sistema cardiovascular. Assim, experimentos com células do endotélio de aorta de porco encontraram que o heptapeptídeo produzia liberação de prostaglandina e que esta estimulação não ocorria através dos receptores AT1 ou AT2 da Ang II, implicando a possível existência de um receptor específico para a Ang-(1-7) (JAISWAL *et al.*, 1992).

A existência de um receptor específico também foi sugerida por vários pesquisadores (BUCZKO; KUCHAREWICZ, 2000; FONTES *et al.*, 1999; PÖRSTI *et al.*, 1994; SANTOS *et al.*, 1994; 1996; SANTOS; CHAMPAGNOLE-SANTOS, 1994).

Em 2003, foi relatado que a Ang-(1-7) se liga ao receptor Mas, uma proteína com sete domínios transmembrana, acoplada à proteína G, até então um receptor órfão (SANTOS *et al.*, 2003).

1.2.2.1 Formação da angiotensina-(1-7)

No SRA a Ang I é convertida em Ang II pela ECA. A Ang II é então clivada pela ECA2 e se transforma em Ang-(1-7). Uma outra via é a hidrólise da Ang I pela ECA2, que é transformada em Ang-(1-9), que, por sua vez, é clivada pela ECA e transformada em Ang-(1-7). É bom lembrar que a ECA também degrada a Ang-(1-7) em Ang-(1-5) - (FERRARIO *et al.*, 1997). Portanto, o uso de inibidores da ECA pode aumentar os níveis circulantes da Ang-(1-7) devido tanto ao aumento da Ang I quanto à diminuição da degradação da Ang-(1-7) (CHAPPELL *et al.*, 1998).

Foram descritas, ainda, três outras enzimas que podem atuar na formação da Ang-(1-7) a partir da Ang I: a prolilendopeptidase (E.C. 3.4.24.26), descrita em cérebro canino e no endotélio vascular (SANTOS *et al.*, 1992; WELCHES *et al.*, 1991); a endopeptidase neutra (E.C.3.4.24.11), presente na circulação sanguínea (YAMAMOTO *et al.*, 1992); e a oligo endopeptidase, estudada em células de músculo liso (CHAPPELL *et al.*, 1994). Essas endopeptidases apresentam expressão relacionada a diferentes tipos de tecidos, o que se acredita ter a produção do heptapeptídeo um controle direto no tecido, sugerindo funções parácrinas.

É importante salientar que a ECA2 possui 400 vezes mais eficiência catalítica com a Ang II do que com a Ang I (VICKERS *et al.*, 2002). Com a ampliação do conhecimento metabólico relacionado à Ang-(1-7), autores já consideram o peptídeo um novo componente do SRA (FERRARIO; IYER, 1998).

1.2.2.2 Mecanismos da Ang-(1-7) na regulação da pressão arterial

O efeito anti-hipertensivo da Ang-(1-7) parece ser devido a vários mecanismos diferentes. Sendo a Ang-(1-7) um dos mais substratos da ECA (FERRARIO *et al.*, 1996), ocorre uma competição com a bradicinina, no processo de degradação (LI *et al.*, 1997). Um segundo mecanismo regulador seria a partir da liberação de prostaglandinas (IYER *et al.*, 2000; PAULA *et al.*, 1995) e um terceiro pela liberação de óxido nítrico pelo endotélio vascular (BROSNIHAN, 1998; PÖRSTI *et al.*, 1994). Outro efeito favorecendo a hipotensão seria no rim, onde a Ang-(1-7) produz natriurese e concomitante diminuição da excreção renal de potássio, além de induzir a produção de prostaciclina (HILCHEY; BELL-QUILLEY, 1995).

1.2.2.3 Mecanismos de ação da Ang-(1-7) no nível molecular

Em relação ao metabolismo celular, experimento investigativo do mecanismo de transdução de sinal envolvendo Ang-(1-7) em células de músculo liso de aorta de coelho, foi encontrado estimulação da liberação do ácido aracdônico e síntese aumentada de 6-keto-PGF1 concomitante com a liberação de prostaciclina. Foi constatado, ainda, que a Ang-(1-7) causa translocação da fosfolipase A2 do citoplasma para o envelope nuclear (MUTHALIF *et al.*, 1998). Em outro estudo, verificou-se que Ang-(1-7) fosforila a *janus kinase 2* (JAK2), o substrato para receptor de insulina 1 (IRS-1) e a proteína kinase B (AKT) no coração de rato (GIANI *et al.*, 2007).

No que se refere a crescimento celular, foi observado que a Ang-(1-7) inibe o crescimento das células de músculo liso (FREEMAN *et al.*, 1996) e que também é capaz de atenuar a formação do endotélio vascular após injúria produzida por balão intra-arterial (STRAWN; FERRARIO; TALLANT, 1999). Além disso, a Ang-(1-7) atenuou a formação da camada endotelial em coronária, após a colocação de *stent* (LANGEVELD *et al.*, 2005).

Investigações dos mecanismos moleculares que inibem o crescimento vascular produzidos pela Ang-(1-7) concluíram que ocorre liberação de

prostaciclina e que a Ang-(1-7) também inibe o estímulo da Ang II na via ERK1/2 (TALLANT; CLARK, 2003). Em ensaio com células neoplásicas, foi encontrado que a Ang-(1-7) reduz o crescimento das células, também por inibição da via ERK1/2 (GALLAGHER; TALLANT, 2004; MENON *et al.*, 2007).

1.2.3 A relação da ANG-(1-7) com a ANG II

Alguns efeitos da Ang II no sistema cardiovascular já eram bem conhecidos, como a vasoconstrição e a liberação de aldosterona (GOODMAN; GILMAN, 1991). Outros efeitos relacionados são o estímulo à produção de proteínas e o crescimento celular de cardiomiócitos (BAKER; ACETO, 1990; DAEMEN *et al.*, 1991), o estímulo à angiogênese (ANDRADE *et al.*, 1996; MACHADO; SANTOS; ANDRADE, 1999) e ao processo de apoptose (GOLDENBERG *et al.*, 2001).

O primeiro efeito produzido pela Ang-(1-7) a ser notado foi a liberação de vasopressina em cérebro de rato, efeito este semelhante ao da Ang II. Desde então, no evoluir das pesquisas, os novos efeitos relacionados com a Ang-(1-7) são geralmente contrários aos da Ang II, sendo o efeito anti-hipertensivo o mais evidente. Em modelo experimental murino, para estudo de angiogênese, demonstrou-se que enquanto a Ang II estimula a angiogênese, a Ang-(1-7) inibe-a (MACHADO; SANTOS; ANDRADE, 1999).

Em experimentos com células de músculo liso, foi verificado que a Ang-(1-7) inibe o efeito mitogênico da Ang II, (TALLANT; DIZ; FERRARIO, 1999). Um dos mecanismos possíveis para esta inibição poderia ser que a Ang-(1-7) reduz a expressão dos receptores At1 da Ang II, cujo efeito é mediado por produtos oriundos da ciclooxigenase (CLARKE *et al.*, 2003). Investigação relacionada à contra-regulação da Ang-(1-7) sobre a Ang II na transdução de sinal mostrou inibição parcial sobre a vasoconstrição e sobre o crescimento celular em músculo liso. Foi encontrada, também, inibição na estimulação da proteína kinase C e no sinal extracelular de kinase (ERK) (ZHU *et al.*, 2002).

Ensaio com astrócitos da medula e cérebro de ratos enfatizou que a Ang II diminuiu em 60% a transcrição gênica da ECA2, sendo esta enzima

importante na geração da Ang-(1-7) e na degradação da própria Ang II (GALLAGER *et al.*, 2006).

1.2.4 O receptor Mas

Em 1986, foram descritos a clonagem e o seqüenciamento de um protooncogene que foi denominado Mas. Esse protooncogene codifica uma proteína hidrofóbica que possui sete passagens transmembranárias. A proteína codificada Mas foi comparada com o receptor de acetilcolina e com o receptor da rodopsina visual. Esta, quando estimulada, ativa uma proteína intracelular ligada ao nucleotídeo guanina. Foi sugerido, então, que a proteína Mas poderia ser um receptor que, ao ser ativado, atuaria numa via metabólica relacionada à regulação do crescimento celular (YOUNG *et al.*, 1988). Posteriormente, os mesmos autores examinaram a expressão da proteína em vários tecidos de rato, descrevendo maior transcrição do RNA em regiões do sistema nervoso central (SNC), principalmente no hipocampo e no córtex cerebral. Sugeriram, ainda, que pela semelhança da seqüência da proteína, ele se parecia com a família de receptores de alguns hormônios (YOUNG *et al.*, 1986). Pesquisa em células transfectadas com o protooncogene Mas relatou que ele codifica um receptor de um peptídeo neural, indicando a possibilidade de estar envolvido em processo de diferenciação e proliferação celular (HANLEY *et al.*, 1990).

O estudo do receptor Mas, de forma comparativa com outros receptores, destacou que esta proteína deveria ser um receptor de angiotensina (JACKSON *et al.*, 1988), enquanto que experimentos posteriores não encontraram resultados que encorajassem essa idéia (AMBROZ; CLARK; CATT, 1991).

A expressão do receptor Mas foi estudada em cérebro de rato, com técnica de hibridização *in situ*, tendo sido encontrada forte marcação no giro dentado, nas áreas CA3 e CA4, hipocampo, tubérculo olfatório, córtex piriforme, bulbo olfatório e marcação fraca a moderada no lobo frontal (BUNNEMANN *et al.*, 1990). Foi também estudado em cérebro e testículo de camundongo, tendo sido relatado que no testículo o RNAm aumenta marcadamente durante o desenvolvimento do indivíduo (METZGER *et al.*, 1995), aparecendo aos 18 dias

de vida e aumentando até seis meses (ALENINA *et al.*, 2002). O receptor Mas foi ainda descrito no ovário de ratas (PEREIRA *et al.*, 2005).

Em 2003, foram apresentadas evidências de que o receptor Mas, antes um receptor órfão, é o receptor da Ang-(1-7) - (SANTOS *et al.*, 2003).

Foi referido, também, em cultura de células de mamífero, que o receptor Mas pode formar um complexo com o receptor AT1, na forma de heterodímero, produzindo efeito inibitório parcial na função do receptor da Ang II (KOSTENIS *et al.*, 2005).

1.3 A relação do sistema renina-angiotensina com o sistema reprodutor

Sendo a renina a enzima iniciadora da cascata de eventos no SRA, as pesquisas nela se concentraram. Esta enzima, que antes se pensava ser apenas de origem renal, foi identificada, por técnica de imunistoquímica, no útero de coelha (FERRIS; GORDEN; MULROW, 1967). Foi também registrada no endométrio de camundongos fêmeas, em maior intensidade nas células glandulares e também nas células perivasculares no miométrio, variando com o ciclo estral, aumentando no estro e diminuindo no diestro (HACKENTHAL *et al.*, 1980). Posteriormente, encontraram Ang I, Ang II, ECA e renina no testículo de rato, nas células de Leydig (PANDEY; MISONO; INAGAMI, 1984).

Estudo utilizando um anticorpo específico para renina ressaltou não existir correlação entre a atividade da renina no testículo de rato e a renina plasmática, indicando independência no controle da enzima tecidual. Revelou, ainda, que em ratos hipofisectomizados, os níveis de renina testicular decrescem significativamente e que a administração de gonadotrofina aumenta novamente a quantidade da enzima (NARUSE *et al.*, 1984).

Durante a prenhez de coelhas, a renina plasmática diminui, enquanto que a renina uterina aumenta (DZAU *et al.*, 1987b), sendo que a maior parte da renina uterina se origina do endométrio (HAGEMANN; NIELSEN; POULSEN, 1994; HSUEH, 1988; SHAW *et al.*, 1989).

Em cultura de células do estroma endometrial, observou-se que a progesterona estimula a síntese de renina (SHAH *et al.*, 1991).

Em outros órgãos do sistema reprodutor também foram encontradas ações do sistema renina-angiotensina, como no ovário e testículos. Em cultura de células de ovário de rata, a Ang II estimula a produção de estradiol, mas não apresenta estímulo na produção de progesterona (PUCELL; BUMPUS; HUSAIN, 1987; Pereira *et al.*, 2005).

Em pacientes tratados com hCG, houve aumento de Ang II no sangue da veia espermática, sugerindo que os esteróides gonadais poderiam influenciar o SRA nas células de Leydig (OKUIAMA *et al.*, 1988).

1.3.1 O sistema renina-angiotensina no endométrio

O conhecimento do SRA no endométrio é incipiente e fragmentado. A primeira citação na literatura foi o relato de renina no útero de coelha (FERRIS; GORDEN; MULROW, 1967). Em estudo posterior, esses autores identificaram renina no endométrio de camundongo fêmea. Por meio de imunoistoquímica, referiram a existência da enzima nas células glandulares, sendo que a marcação era mais intensa durante o estro e menos intensa no diestro (HACKENTHAL *et al.*, 1980). Durante prenhez de coelha, a forma ativa da renina uterina aumenta 40 vezes e esse aumento parece ser independente da renina renal (DZAU *et al.*, 1987b).

Na espécie humana, no útero, a maior fonte de renina é o endométrio (HSUEH, 1988). A renina é expressa no endométrio em maior quantidade na sua forma inativa, ocorrendo em quantidade menor na forma ativa (SHAH *et al.*, 1991).

A renina foi identificada primeiramente nas células estromais, tendo sido demonstrado que a progesterona, em cultura celular, induz a aumento na expressão e que a decídua produz maior quantidade de renina do que as células do estroma (SHAW *et al.*, 1989; SHAH *et al.*, 1991).

Em outro relato, a renina foi demonstrada por imunoistoquímica nas células do epitélio glandular do endométrio, com marcação intensa, e nas células estromais a marcação foi de fraca a moderada, durante a fase proliferativa, e negligível na fase secretora (LI; AHMED, 1997).

A ECA é expressa no endométrio pelas células do epitélio glandular e pelas células do endotélio vascular. No estroma, a marcação por imunohistoquímica foi fraca a moderada na fase proliferativa e na fase secretora a marcação foi negligível. Foi demonstrado, por técnica de *western blot*, que a ECA aparece em maior quantidade no endométrio menstrual e no endométrio secretor tardio. A menor quantidade foi encontrada no endométrio proliferativo tardio e no endométrio secretor inicial (LI; AHMED, 1997).

A Ang II foi localizada no endométrio, durante a fase proliferativa, no epitélio glandular e no estroma, tendo apresentado marcação fraca em torno do tecido vascular. Em contraste, no endométrio secretor, intensa marcação foi detectada nas células estromais, em torno dos vasos, onde foi sugerido estar participando do fenômeno da decidualização (SQUIRES; KENNEDY, 1992); e fraca marcação nos outros tipos celulares (AHMED *et al.*, 1995).

Inicialmente, acreditou-se que o útero humano só expressava o receptor AT2 da Ang II (WHITEBREAD *et al.*, 1989), mas evidências posteriores mostraram que é o miométrio quem expressa somente esse receptor e o endométrio expressa os dois receptores da Ang II (AHMED *et al.*, 1995; SARIDOGAN *et al.*, 1996). O receptor AT1 aumenta a sua expressão do início até o final da fase proliferativa, e alcança o máximo da sua expressão no início da fase secretora (AHMED *et al.*, 1995).

Em que pese a importância fisiológica dos novos componentes do SRA, até o momento nenhum estudo avaliou se o heptapeptídeo Ang-(1-7), seu receptor Mas e a enzima ECA2 estão presentes no endométrio.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a expressão da Ang-(1-7), do receptor Mas e da ECA2 no endométrio humano.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a localização imunoistoquímica da Ang-(1-7) nas células epiteliais e estromais do endométrio humano, nas fases proliferativa e secretora.
- Verificar a presença do receptor Mas nas células epiteliais e estromais, nas fases proliferativa e secretora do endométrio humano.
- Determinar a expressão gênica da ECA2 nas células epiteliais e estromais, nas fases proliferativa e secretora do endométrio humano.

3 METODOLOGIA

3.1 Parecer ético

O projeto desta pesquisa foi primeiramente aprovado pela Câmara Departamental de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFMG.

O protocolo final da pesquisa, sob o número 0076.0.203.000-07, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG) em 25/04/07 (ANEXO A). Parte do protocolo havia sido aprovada pelo COEP em 14/09/2005, sob o número 0010.0.203.000-5.

A execução da pesquisa também requereu a aprovação da Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão (DEPE) do Hospital das Clínicas (HC) da UFMG, da Unidade Funcional Centro Cirúrgico HC-UFMG, do Serviço de Ginecologia HC-UFMG e do Laboratório de Endocrinologia e Metabologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

3.2 Sujeitos da pesquisa

Foram selecionadas mulheres no menacme, com ciclos regulares, que não estavam em uso de medicamentos hormonais há pelo menos três meses. Essas pacientes não haviam usado dispositivo intra-uterino (DIU) nos últimos seis meses, não eram portadoras de doenças sistêmicas e não apresentavam evidência clínica, ecográfica ou histeroscópica de doença endometrial.

Três séries de casos e uma coleção de culturas celulares foram incluídas no estudo (FIG. 1). A série de casos 1 (n=10) foi constituída por mulheres de 38-47 anos que iriam se submeter à histerectomia por condição benigna, como mioma, na fase folicular do ciclo menstrual. No bloco cirúrgico do Hospital das Clínicas, imediatamente após a histerectomia, procedeu-se ao lavado endometrial *ex-vivo*, com instilação de 1 mL de coquetel de inibidores de proteases diluído em 1 mL de solução fisiológica estéril, perfazendo um volume final de 2mL. O coquetel de inibidores de proteases consistia em

fenilmetilsulfonilfluorida 10^{-5} M, pepstatina a 10^{-5} M, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 10^{-5} M, *p*-hidroximercuribenzoato 10^{-5} M e ortofenantrolina 9×10^{-4} M, todos adquiridos da *Sigma-Aldrich Corp.* O lavado endometrial era aspirado, transferido para um tubo imerso em gelo e estocado a -80°C até o momento da extração dos peptídeos para quantificação por radioimunoensaio.

A série 2 foi constituída por 24 mulheres submetidas à histeroscopia ou laparoscopia no setor de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da UFMG, em preparação para tratamentos de infertilidade por fator masculino ou tubário. As pacientes, com idades de 26-41 anos, apresentavam exame histeroscópico normal, ciclos menstruais regulares e ovulação confirmada por rastreamento ecográfico. Biópsias endometriais foram obtidas por aspiração com *Pipelle*® após histeroscopia ou laparoscopia. O material foi fixado em formol 10% tamponado em solução salina de fosfato tamponada (PBS), incluído em parafina e posteriormente processado para análise histológica e imunistoquímica. As pacientes dessa série haviam sido recrutadas para um estudo anterior, em 2003, e as respectivas amostras endometriais, conservadas em blocos de parafina, foram recuperadas para inclusão no presente estudo.

A série 3 foi formada por 11 mulheres com idades de 30-47 anos submetidas à histeroscopia diagnóstica ou cirúrgica por condições benignas nas fases proliferativa ($n=6$) e secretora ($n=5$) do ciclo menstrual. A fase do ciclo foi confirmada pelos exames histopatológicos. Amostras de endométrio foram coletadas durante ou após a histeroscopia e conservadas em solução inibidora de RNase (RNA *holder*, BioAgency, São Paulo, SP) a -20°C até a extração do RNA.

As amostras de culturas celulares foram oriundas do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade do Texas em San Antonio (Estados Unidos da América - EUA), gentilmente cedidas pelos Drs. Márcia C. Ferreira e Craig A. Witz. As técnicas de coleta endometrial, digestão enzimática, purificação, caracterização e cultivo primário de células epiteliais e estromais derivadas do endométrio humano foram descritas detalhadamente em publicações recentes (LUCIDI *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2008). Neste estudo, utilizaram-se lâminas de cultura (*chamber slides*) e amostras de DNA complementar correspondentes a culturas de células epiteliais ($n=7$) e estromais ($n=6$).

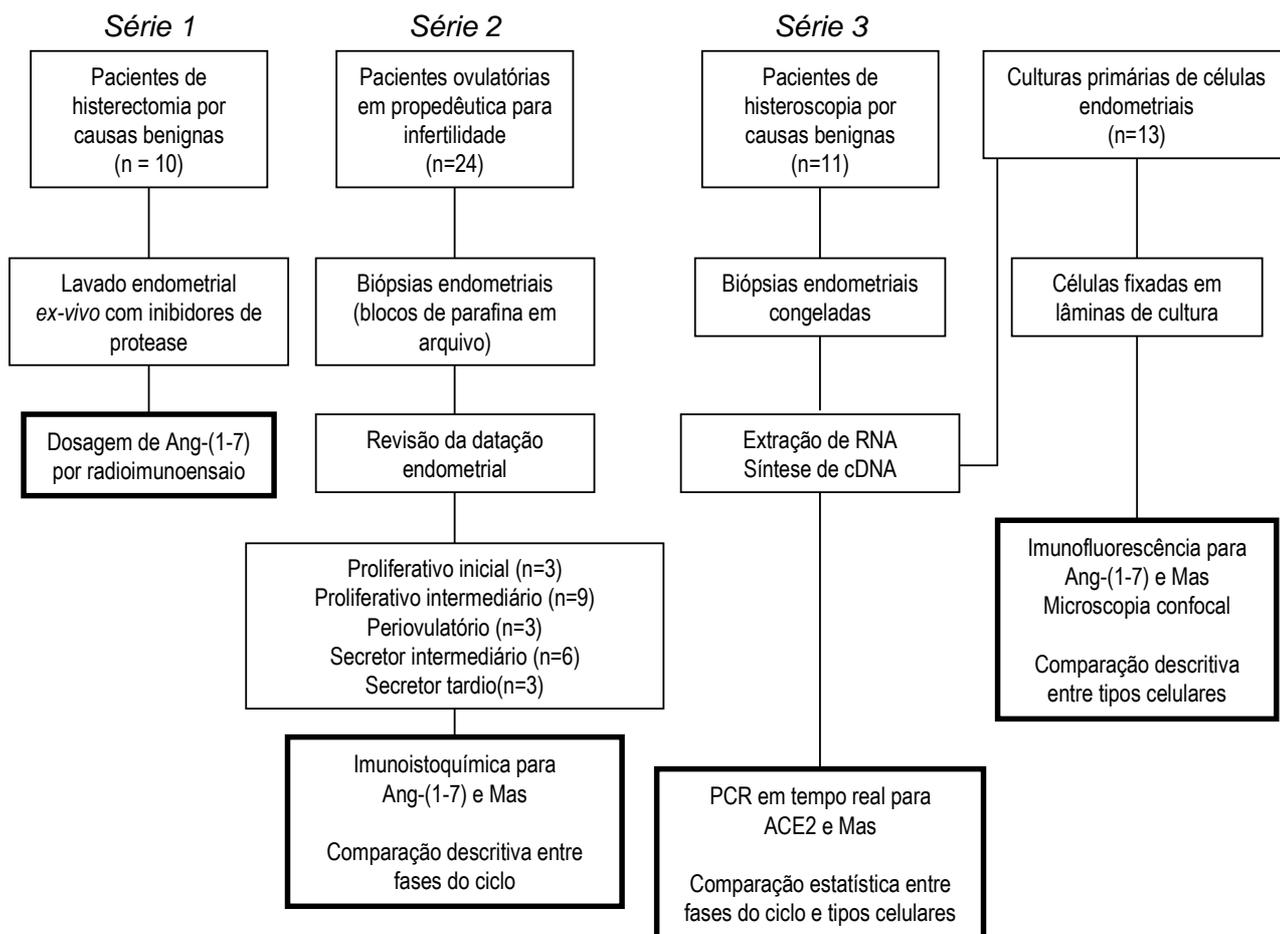


FIGURA 1 - Diagrama representando as três séries de casos incluídas no estudo, além das amostras de culturas de células de endométrio.

Os resultados da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real puderam ser avaliados estatisticamente comparando-se dois grupos de pacientes classificadas de acordo com a fase do ciclo menstrual (série de casos 3, subdividida entre fases proliferativa e secretora) e confrontando-se dois grupos de culturas celulares: epiteliais vs. estromais.

3.3 Dosagem de Ang-(1-7) por radioimunoensaio

As amostras congeladas de lavado endometrial foram enviadas ao Laboratório de Hipertensão do ICB-UFMG para determinação da concentração de Ang-(1-7) por radioimunoensaio. A equipe técnica do laboratório utilizou, nas etapas de extração e dosagem do peptídeo, as metodologias já publicadas pelo mesmo grupo (BOTELHO *et al.*, 1994; COSTA *et al.*, 2003; SIMÕES E SILVA *et al.*, 2004). O limite de detecção do ensaio é de 3,25 pg/tubo, correspondentes à

concentração de Ang-(1-7) nas amostras de 32,5 pg/mL. Os coeficientes de variação intra e interensaio foram, respectivamente, 4,8 e 8,6%.

3.4 Imunoistoquímica do tecido endometrial

Os blocos de parafina contendo amostras de tecido endometrial (série de casos 2, FIG. 1) foram resfriados, levados ao micrótomo e seccionados em fatias de 4 μm de espessura. Os cortes foram recolhidos em banho de água aquecida e cuidadosamente transferidos, com a ajuda de um pincel fino, para lâminas de vidro previamente gelatinizadas. As lâminas foram então incubadas em estufa a 60°C durante 20 minutos para escorrer o excesso de parafina.

Um corte de cada amostra foi corado por hematoxilina e eosina para se aferir a datação do endométrio segundo os critérios de Noyes, Hertig e Rock (1950), tendo sido esta aferição realizada por outro pesquisador. As amostras foram datadas como endométrio proliferativo inicial (n=3), proliferativo intermediário (n=9), periovulatório (n=3), secretor intermediário (n=6) e secretor tardio (n=3). Uma amostra de implante endometriótico peritoneal datado como secretor intermediário foi também incluída nos testes imunoistoquímicos, para efeito de controle de especificidade.

3.4.1 Princípios da técnica

Os ensaios de imunoistoquímica foram realizados com a técnica da avidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE; FINGER, 1981). A avidina é uma glicoproteína presente na clara do ovo de galinha, de alto peso molecular (PM=68.000 D), de caráter básico (pH=10,4), que apresenta forma tetramérica com quatro subunidades de 128 aminoácidos cada uma, apresentando grande afinidade pela biotina.

A biotina é uma vitamina de baixo peso molecular (PM=244,3 D), hidrossolúvel, produzida por bactérias intestinais, presente também no fígado e na gema do ovo. Pode ser ligada covalentemente a carboidratos e proteínas sem interferir nessas moléculas, devido, em parte, ao seu tamanho.

As peroxidases formam um grande grupo de enzimas que participam dos processos de oxidação e redução. A peroxidase utilizada nesse ensaio é uma *horseradish* peroxidase, enzima de 40 kD isolada da planta *horseradish*, pertencente à família Brassicacea. Apresenta um grupo heme ligado a um átomo de ferro que funciona como um comutador de elétrons.

A reação se processa com a ligação do primeiro anticorpo ao antígeno investigado; e o segundo anticorpo, já conjugado à biotina, se acopla ao primeiro. Aplica-se à avidina, que se liga através de um dos seus quatro sítios à biotina do segundo anticorpo, enquanto a biotina ligada à peroxidase ocupa os três sítios livres da avidina, produzindo efeito amplificador do processo. A introdução do cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) produz uma coloração marrom-amarelado estável, que permite identificar, ao microscópio, os sítios de imunomarcação.

3.4.2 Materiais utilizados

Os anticorpos primários foram produzidos no Laboratório de Hipertensão do ICB-UFMG. O anticorpo policlonal para Ang-(1-7) foi feito em coelho, utilizando como imunógeno Ang-(1-7) sintética, e não apresenta reação cruzada com outros membros do sistema renina-angiotensina (SIMÕES E SILVA *et al.*, 2004). O anticorpo para o receptor Mas foi produzido em camundongo *knockout*, usando como imunógeno o peptídeo sintético LAEEKAMNTSSR, correspondente à porção amino-terminal do receptor Mas de camundongo (COSTA-GONÇALVES *et al.*, 2007). Esse anticorpo reconhece o receptor Mas humano devido à homologia de seqüências entre as duas espécies e é comparável ao anticorpo anti-Mas humano comercialmente disponível (SAMPAIO *et al.*, 2007a).

O *kit* utilizado nos ensaios foi o *Vectastain* (*Vector Laboratories*, Burlingame, CA, EUA) contendo anticorpo secundário biotilado universal (anticoelho e camundongo) produzido em eqüino, soro de eqüino normal e complexo avidina-biotina-peroxidase.

3.4.3 Seqüência do processo

Primeiro dia:

- desparafinização dos cortes com xilol (xilol 1 e 2; 15 minutos cada);
- hidratação nos álcoois (98-90-80-70-50%; 5 minutos cada);
- lavagem em água destilada, por 1 minuto;
- digestão enzimática com solução de tripsina durante 15 minutos para recuperação de sítios antigênicos (somente na imunocoloração para o receptor Mas);
- bloqueio das peroxidases endógenas com metanol + H₂O₂ a 3% por 30 minutos;
- lavagem em PBS, 10 minutos;
- incubação com soro normal, para bloqueio de sítios antigênicos inespecíficos; 30 minutos (diluição 1:30);
- incubação com anticorpo primário:
 - a) antiAng-(1-7) diluído 1:2000 em PBS e incubado por 16-18 horas a 4°C;
 - b) antiMas diluído 1:100 e aplicado por 48 horas a 4°C;

Segundo dia:

- lavagem com PBS, 10 minutos;
- incubação com anticorpo secundário (1:200), 30 minutos;
- lavagem com PBS, 10 minutos;
- incubação com complexo AB (1:200) 1 hora;
- lavagem com PBS, 10 minutos;
- coloração com DAB (3 a 5 minutos);
- lavagem com PBS, 5 minutos;
- contracoloração com hematoxilina (imersão rápida);
- lavagem em água destilada, 5 minutos;
- desidratação com álcoois graduados (50-98%), 5 minutos cada;
- passagem em xilol 3 e 4, por 5 minutos em cada;
- montagem com lamínula e *Entellan*.

Como controle negativo, foi utilizado o mesmo tecido endometrial; e na seqüência do processo de imunistoquímica substituiu-se o primeiro anticorpo por imunoglobulina de coelho não imunizado. O controle positivo utilizado foi corte de testículo de camundongo adulto (ALENINA *et al.*, 2002; METZGER *et al.*, 1995).

3.4.4 Análise da imunistoquímica

As lâminas foram fotografadas em microscópio ótico (*Olympus BX-41*) acoplado à microcâmara e as imagens captadas em microcomputador pelo *software Spot Insight Color*. As lâminas foram examinadas no mesmo microscópio, com a mesma intensidade de luz, por dois examinadores independentes, sendo os resultados anotados como:

–	negativo
+	intensidade fraca da coloração
++	intensidade moderada da coloração
+++	intensidade forte da coloração

3.5 Avaliação da expressão gênica da ECA2 e do receptor Mas

3.5.1 Extração do RNA total

Os fragmentos de endométrio estocados a -20°C em RNA *holder* (série de casos 3, FIG. 1) foram colocados em tubos plásticos estéreis contendo solução de fenol e isotiocianato de guanidina (TRIzol® *Reagent, Invitrogen, Carlsbad CA, USA*), na proporção de 1 mL para cada 100 mg de tecido. Os fragmentos foram triturados com homogenizador elétrico *Polytron* até dissociação completa do tecido e, em seguida, os tubos foram tampados e deixados em temperatura ambiente por 5 minutos.

Foram adicionados a cada tubo 200 μL de clorofórmio e realizada agitação manual vigorosa por 3 vezes e novamente deixado em repouso por 3 minutos. A seguir, o material foi centrifugado durante 15 minutos a 12.000 rotações por minuto (rpm) a 4°C . Após a centrifugação, a fase líquida foi pipetada

com cuidado para novos tubos estéreis e numerados e adicionado isopropanol gelado, 500 µL em cada tubo, realizada homogenização manual e armazenados a -20°C (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987).

No dia seguinte, os tubos passaram por uma segunda centrifugação durante 15 minutos, a 12.000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado com cuidado e o precipitado foi tratado com 1 mL de etanol a 75% em água autoclavada com dietilpirocarbonato (DEPC) e feita homogenização rápida no vórtex (rotação n° 2, por duas vezes). Os tubos foram centrifugados novamente a 7.500 rpm, a 4°C, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado com cuidado e o precipitado deixado secar no tubo por 15 minutos.

3.5.2 Quantificação do RNA extraído

O precipitado de RNA foi dissolvido em 50 µL de água DEPC e aquecido a 60°C por 10 minutos para desnaturar. Foi retirada uma alíquota de 10 µL de cada amostra e diluída em 990 µL de água DEPC e a solução resultante submetida à leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorvâncias a 260 nm e 280 nm se situava entre 1,6 e 2,0.

Considerando-se que uma unidade de absorvância a 260 nm corresponde a 40 µg de RNA por mL de solução, a concentração de RNA na solução original foi calculada pela fórmula:

$$[\text{RNA}] = A_{260 \text{ nm}} \times D \times 40 \text{ µg/mL}$$

onde: A= absorvância

D= diluição da alíquota usada para quantificação, no caso 100, visto que 10 µL da solução original foram diluídos em 990 µL de água.

Da amostra original, foi coletada alíquota de 1 µg para construção do cDNA.

3.5.3 Síntese do DNA complementar

A obtenção do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de transcrição reversa utilizando oligonucleotídeos complementares à cauda poliA do mRNA. Foi utilizado o *kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil)*.

Em tubo estéril foram colocados: 1 µg de RNA, 1 µL de oligo (dT), 1 µL de tampão específico e 1 µL de água livre de DNase/RNase. Os tubos foram incubados a 65°C por 5 minutos e logo após acondicionados em gelo. Adicionaram-se 10 µL de solução 2x *First-Strand Reaction Mix* e 2 µL de solução contendo a enzima transcriptase reversa *Superscript™ III* e inibidor de RNase. A solução foi mantida a 50°C por 50 minutos para a síntese do DNA complementar. A reação foi encerrada por aquecimento a 70°C por 5 minutos e resfriamento a 4°C.

Como controle negativo, uma amostra de RNA extraído de tecido endometrial foi submetida à reação de síntese de cDNA, com omissão da transcriptase reversa, que foi substituída por 1 µL de água DEPC.

3.5.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

A reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real é metodologia adequada para se estudar a expressão de determinado gene. Essa tecnologia apresenta precisão, sensibilidade e resolução superiores às da PCR tradicional. Os resultados são expressos em números e podem ser acessados rapidamente, enquanto a reação está ainda se processando, em sua fase exponencial. Na PCR utilizou-se um composto fluorescente, o *SYBR GREEN*, substância com afinidade por nichos (*minor groove*) na dupla hélice do DNA. Quando em solução, esta substância apresenta pouca fluorescência, mas durante os ciclos da PCR, quando são gerados cada vez mais amplicons, o acúmulo do corante nos nichos faz com que a fluorescência aumente a cada ciclo da reação, em razão direta à formação dos amplicons, podendo ser detectada, quantificada e comparada.

No primeiro ciclo da reação, as fitas do cDNA são copiadas em fitas longas, não delimitadas na extremidade 3' e, com a sucessão dos ciclos, começam a ser gerados os amplicons de fitas curtas, que terão a quantidade mensurada. As cópias de fitas longas continuarão a ser produzidas, mas isto

ocorre em progressão linear e, portanto, se tornarão negligenciáveis frente à quantidade de amplicons que serão gerados de modo exponencial. É este aumento exponencial o determinante da ascensão da curva logarítmica.

O método possui uma linha de corte que é situada nas curvas logarítmicas, em um ponto denominado CT (*threshold cycle*), definido como o local em que a fluorescência emitida apresenta o primeiro registro estatisticamente superior à fluorescência basal. Este local situa-se sempre na fase de crescimento exponencial da curva, sempre abaixo das fases de crescimento linear e do platô (GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1999). Aí são obtidos os valores de quantificação absoluta ou relativa (LIVAK; SCHMITTIGEN, 2001; YUAN *et al.*, 2006).

A metodologia da PCR em tempo real utilizou o mesmo protocolo em todas as reações, mantendo as concentrações usuais de reagentes para um volume final de 25 μ L. Cada amostra foi preparada em duplicata. Foram usados 2 μ L de cDNA e 23 μ L de uma solução *mix* composta de 2 μ L de água para PCR, 2 μ L do *primer* senso (10 pmol/ μ L), 2 μ L do *primer* anti-senso (10 pmol/ μ L) - (*Invitrogen* do Brasil, São Paulo, SP) e 17 μ L de *SYBR GREEN Mix* (*Applied Biosystems*, Warrington WA, UK).

Foram desenhados três pares de oligonucleotídeos iniciadores da PCR referentes aos genes da ECA2, do receptor Mas e da proteína ribossomal S26 (controle interno) a partir das seqüências publicadas na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). A escolha das seqüências foi feita com auxílio de um *software* livre (*GenScript Corp.*, Piscataway, NJ, EUA), que observa, entre outros critérios, a similaridade na temperatura de fusão e a não-complementaridade nas extremidades 3' de cada par de oligonucleotídeos. Foi utilizada a estratégia de situar os oligonucleotídeos em regiões de transição intron-exon, para prevenir a amplificação de DNA genômico contaminante. A seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores é visualizada no QUADRO 1.

As reações foram realizadas em um termociclador ABI PRISM 7000 SDS (*Applied Biosystems* Warrington WA, UK) com a seguinte programação:

- Estágio 1: um ciclo de 52°C/2 minutos
- Estágio 2: um ciclo termal de 95°C/10 minutos
- Estágio 3: 40 ciclos de 95°C/15 minutos e 50°C/1minuto.

QUADRO 1

Oligonucleotídeos iniciadores usados nas reações de PCR em tempo real

	Seqüência (5' to 3')	Fragmento	Código GenBank
Mas			
senso	ttccgatgagaagaaatcc	129 pb	NM_002377
anti-senso	atggccagaagaaagctcat		
ECA2			
senso	ctgctcattgcttggtgat	111 pb	NM_021804
anti-senso	ggtccaccattgcatcagta		
S26			
senso	tgtgctccaagctgtatgtgaag	75 pb	NM001029
anti-senso	cgattcctgactactttgctgtgaa		

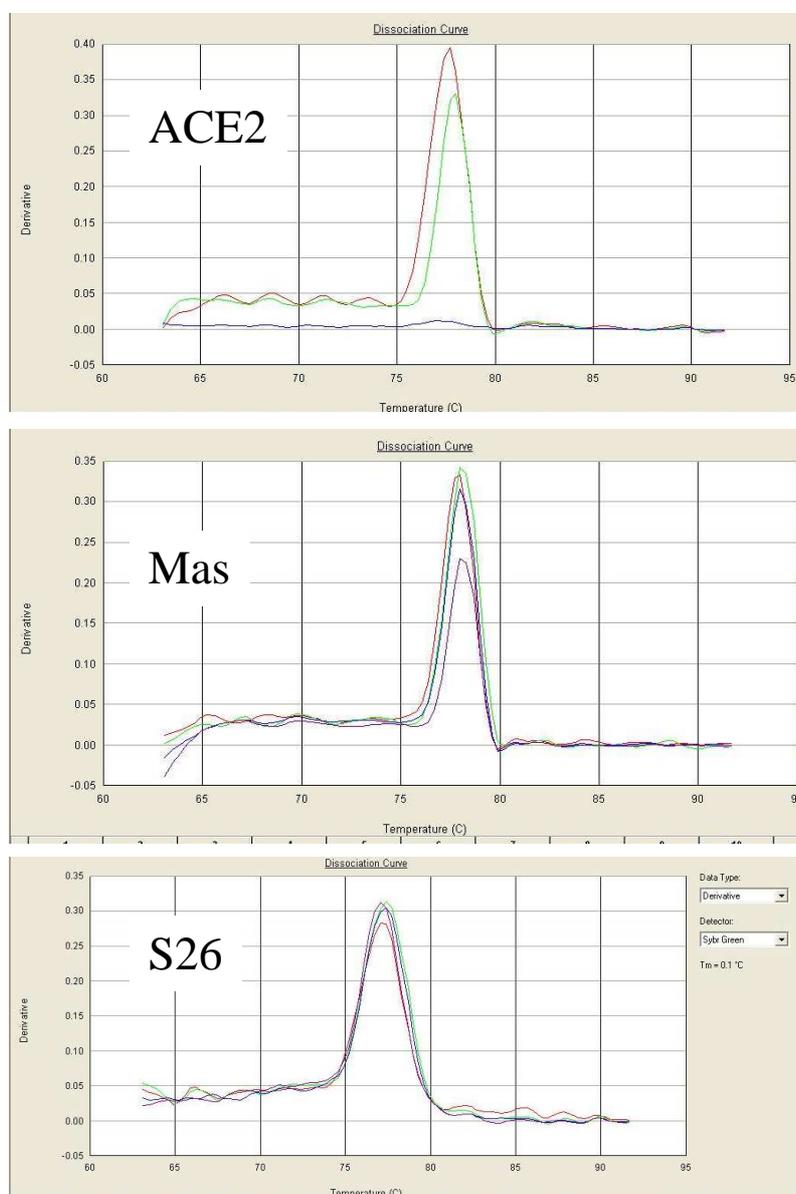


FIGURA 2 - Curvas de dissociação da PCR em tempo real.

A presença de pico único denota a pureza dos produtos da PCR.

3.5.5 Análise da especificidade dos produtos da PCR

Conforme a FIG. 2, as reações da PCR exibiram curvas de dissociação uniformes, com pico único, indicando a especificidade dos produtos gerados.

Os amplicons dos genes Mas, ECA2 e S26 obtidos por PCR em tempo real foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 4%. O gel foi preparado com diluição de 2 g de agarose em 50 mL de tampão para eletroforese (TAE, *Invitrogen* do Brasil) e deixado polimerizar à temperatura ambiente. Foi então colocado em cuba de eletroforese e imerso em tampão TAE. Foram depositadas no gel alíquotas de 12 µL de cada solução obtida na reação de PCR e também um marcador de pares de base como indicador de migração (50 pb). Foi adicionado também brometo de etídio (2 µl/50mL de gel) para posterior visualização sob luz ultravioleta em um transiluminador acoplado a uma câmara fotográfica digital.

Na FIG. 3, verificam-se fragmentos de 111, 129 e 75 pares de bases obtidos nas reações de PCR para ECA2, Mas e S26, respectivamente, o que corresponde exatamente ao tamanho dos amplicons previstos, com base na localização dos oligonucleotídeos iniciadores na seqüência de cada gene (QUADRO 1).

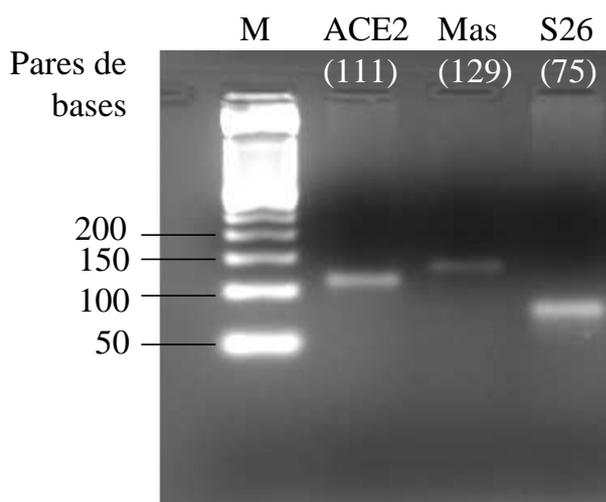


FIGURA 3 - Eletroforese em gel de agarose 4% comprovando a presença de banda única nos produtos de amplificação dos genes da ECA2, do receptor Mas e da proteína ribossomal S26.

M = marcador de peso molecular (escada de 50 pares de bases).

3.5.6 Análise quantitativa dos resultados do PCR

Os valores do CT obtidos de cada reação em duplicata foram usados para calcular o CT médio de cada amostra. Esses valores foram usados para quantificar o cDNA presente na amostra, por meio de uma curva-padrão construída com diluições seriadas de uma amostra de referência (FIG. 4 e 5). A partir da equação linear obtida pela análise de regressão dos resultados da curva-padrão ($CT = a \cdot \log ng \text{ cDNA} + b$), calculou-se, para cada amostra em estudo, o conteúdo de cDNA correspondente a cada gene amplificado. Os resultados foram então expressos como razão da expressão do gene de interesse (ECA2 ou Mas), pela expressão do gene de controle interno (S26).

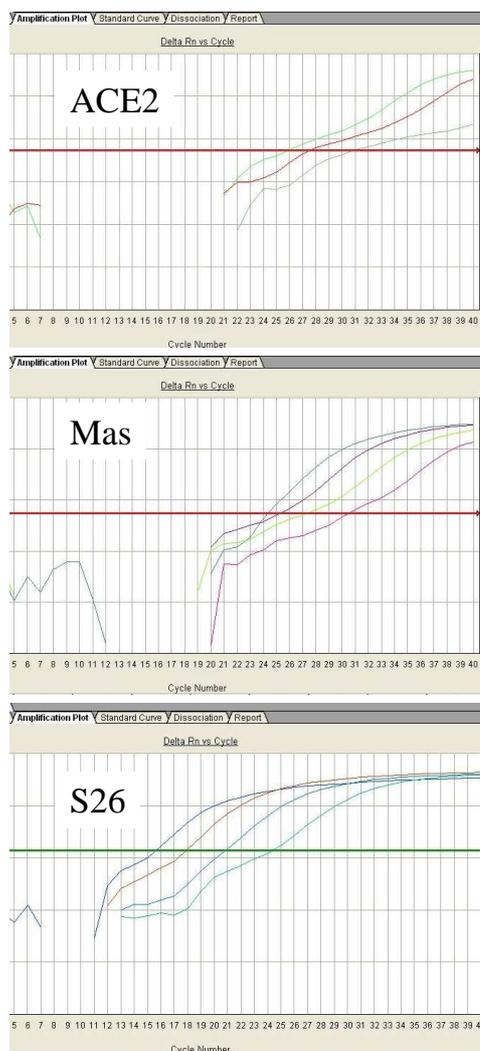


FIGURA 4 - Curvas de amplificação da PCR em tempo real.

As séries de curvas correspondem, da esquerda para a direita, à amostra padrão de cDNA não diluída, diluída 1:10, 1:100 e 1:1000.

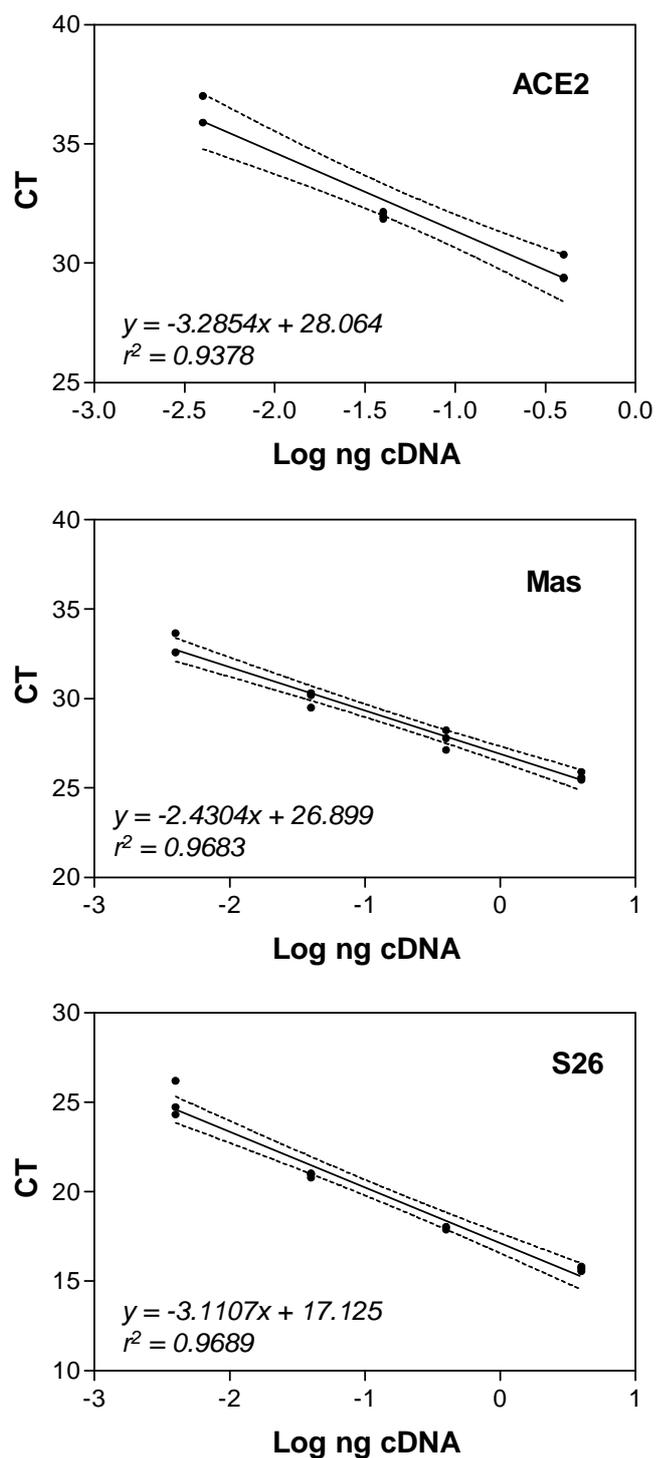


FIGURA 5 - Curvas de regressão linear utilizadas para cálculo dos resultados da PCR em tempo real.

CT= ciclo limiar. A curva da ECA2 foi construída com apenas três dos quatro padrões, para permitir melhor ajuste da equação ($r^2=0,94$) na faixa de concentração correspondente à maioria das amostras em estudo. As linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança de 95%.

3.6 Imunofluorescência e microscopia confocal

Células epiteliais e estromais cultivadas em lâminas de vidro com subdivisões (*chamberslides*) foram lavadas com solução de tampão fosfato duas vezes, fixadas com acetona resfriada (-20°C), cobertas com uma camada de parafina e mantidas a 4°C até os procedimentos de coloração. As lâminas foram desparafinizadas em xilol, reidratadas por meio de série de álcoois em concentrações decrescentes e incubadas em tampão fosfato, *Tween* 0,2% (peso/volume) e albumina bovina sérica a 5% por 15 minutos.

Em seguida, as células foram incubadas com o primeiro anticorpo (o mesmo utilizado na imunistoquímica) diluído a 1:200, por 24 horas a 4°C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em tampão fosfato (três vezes por 5 minutos) e incubadas com o segundo anticorpo (diluição a 1:400, Alexa 594, Molecular Probes) por 2 horas à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com tampão Tris 50 mM e as células foram cobertas com meio de montagem glicerol/Tris e lamínula de vidro. Imagens fluorescentes foram obtidas usando um microscópio confocal Zeiss 510 *metalaser*, equipado com objetiva de imersão (63x).

3.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, que comprovou que sua distribuição não divergia significativamente da curva normal. Portanto, os resultados são apresentados como média \pm erro-padrão da média. Diferenças entre dois grupos de tecido endometrial foram analisadas pelo teste *t* de Student para amostras independentes, ao passo que diferenças entre dois tipos celulares foram avaliadas pelo teste de Wilcoxon para dois grupos pareados. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

4 RESULTADOS

4.1 Detecção de Ang-(1-7) imunorreativa no lavado endometrial

Por meio de radioimunoensaio, a presença de Ang-(1-7) foi detectada nas amostras de lavado endometrial. As concentrações de Ang-(1-7) variaram de 33 pg/mL, que corresponde ao limite de detecção do ensaio, a 121 pg/mL.

4.2 Localização da Ang-(1-7) no endométrio

Como pode ser visto na FIG. 6, a Ang-(1-7) apresentou, nas células epiteliais glandulares, imunomarcção fraca a moderada na fase proliferativa e moderada marcação na fase periovulatória, com intensa imunocoloração na fase secretora intermediária e tardia.

As células epiteliais superficiais mostraram moderada intensidade na marcação tanto na fase proliferativa quanto na fase secretora do endométrio. As células estromais tinham moderada a intensa imunocoloração na parte inicial da fase proliferativa e fraca imunocoloração na fase secretora. As estruturas microvasculares do endométrio possuíam intensidade negativa a fraca na imunocoloração, na pesquisa da Ang-(1-7), tanto na fase proliferativa quanto na fase secretora (FIG. 6).

Nas células endometriais cultivadas e marcadas com imunofluorescência, a microscopia confocal evidenciou marcação predominantemente citoplasmática para Ang-(1-7) nas células epiteliais, ao passo que nas células estromais o peptídeo teve expressão muito fraca, quase indetectável (FIG. 7).

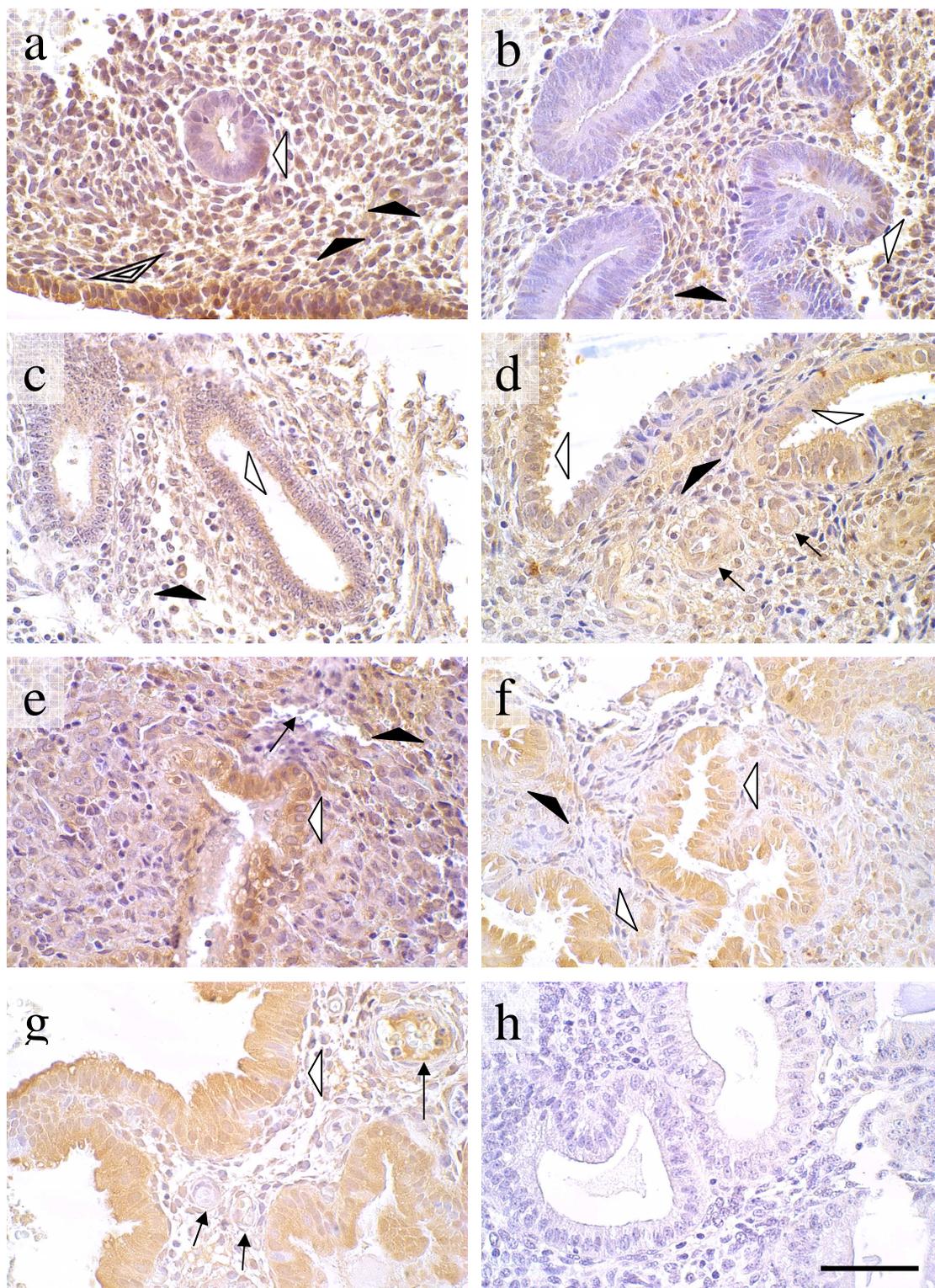


FIGURA 6 - Localização de Ang-(1-7) no endométrio humano em diferentes fases do ciclo menstrual.

As áreas coradas em marrom indicam imunomarcação para Ang-(1-7) no ep t lio glandular (setas brancas) e no estroma (triângulos pretos). Alguns vasos estromais são apontados por setas pretas. **a)** proliferativo inicial, com forte marcação do ep t lio de superfície (triângulo duplo); **b)** proliferativo intermediário; **c,d)** periovulatório; **e)** secretor intermediário; **f)** secretor tardio; **g)** endometriose peritoneal na fase secretora; **h)** controle negativo. Barra = 50 μ m.

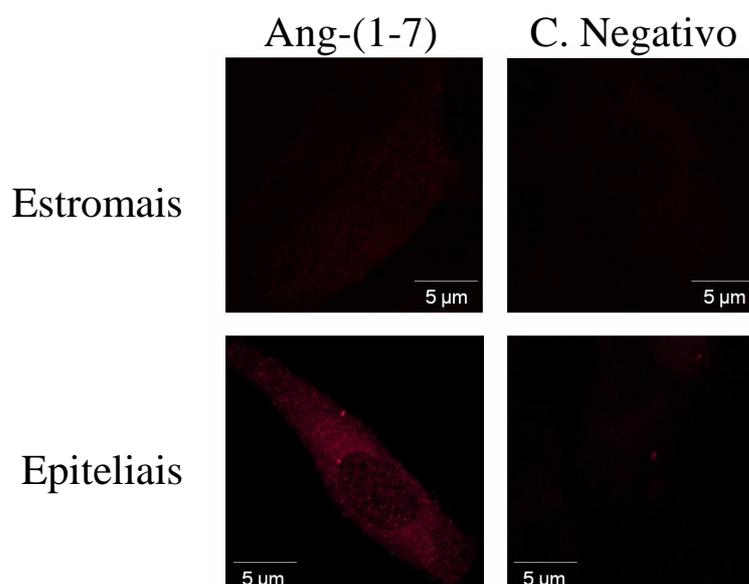


FIGURA 7 - Imunofluorescência e microscopia confocal mostrando a localização intracelular da imunomarcagem para Ang-(1-7) em células endometriais cultivadas.

4.3 Expressão da enzima conversora de angiotensina tipo 2 no endométrio

A expressão gênica da ECA2, determinada por reação de PCR em tempo real, demonstrou que a quantidade de mRNA encontrado na fase secretora foi 6,6 vezes maior do que a encontrada na fase proliferativa do endométrio ($p < 0,01$, FIG. 8, GRÁF. B).

A expressão gênica da ECA2 nas células epiteliais foi duas vezes maior do que nas células estromais ($p < 0,05$, FIG. 8, GRÁF. A).

4.4 Localização do receptor Mas no endométrio

A imunolocalização da proteína Mas mostrou marcação nas células epiteliais superficiais, no epitélio glandular e nas células estromais, com

intensidade semelhante nesses diferentes tipos celulares (FIG. 9). Também não foi evidenciada diferença na intensidade entre as fases proliferativa e secretora.

As estruturas microvasculares do endométrio exibiram imunocoloração negativa a fraca (FIG. 9).

Nas células endometriais cultivadas e marcadas com imunofluorescência, a localização do receptor Mas foi predominantemente extranuclear (FIG. 10).

4.5 Expressão do mRNA do receptor Mas nas células epiteliais e estromais do endométrio

A reação de PCR em tempo real comprovou a expressão do mRNA do receptor Mas nas biópsias endometriais de ambas as fases do ciclo menstrual, assim como nas células endometriais cultivadas *in vitro*. Não se observou diferença significativa na expressão gênica do receptor MAS nas células epiteliais, quando comparadas com a expressão nas células estromais (FIG. 11, GRÁF. A). Na comparação entre biópsias endometriais obtidas em diferentes fases do ciclo menstrual, observou-se maior concentração de mRNA do receptor Mas nas amostras de endométrio proliferativo em comparação com aquelas de endométrio secretor ($p < 0,05$, FIG. 11, GRÁF. B).

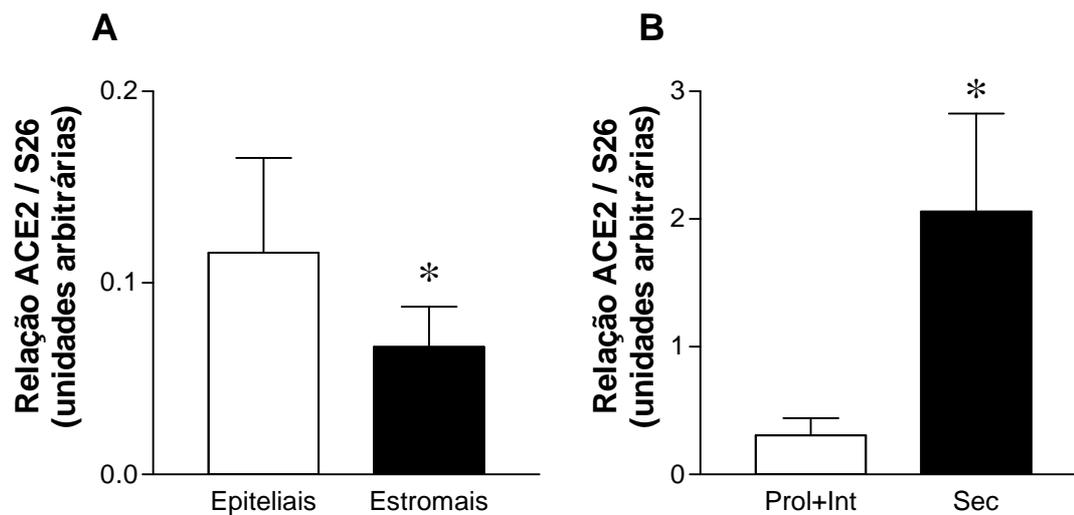


FIGURA 8 - Expressão do mRNA para ECA2 em células endometriais cultivadas e em amostras de tecido endometrial datadas como endométrio proliferativo ou periovulatório (Prol+Int) vs. secretor.

Os dados são expressos como média \pm erro-padrão da expressão gênica corrigida de ECA2 corrigida para o controle interno S26. * $p < 0,05$ para comparações entre tipos celulares (teste de Wilcoxon) ou entre fases do ciclo (teste t de Student).

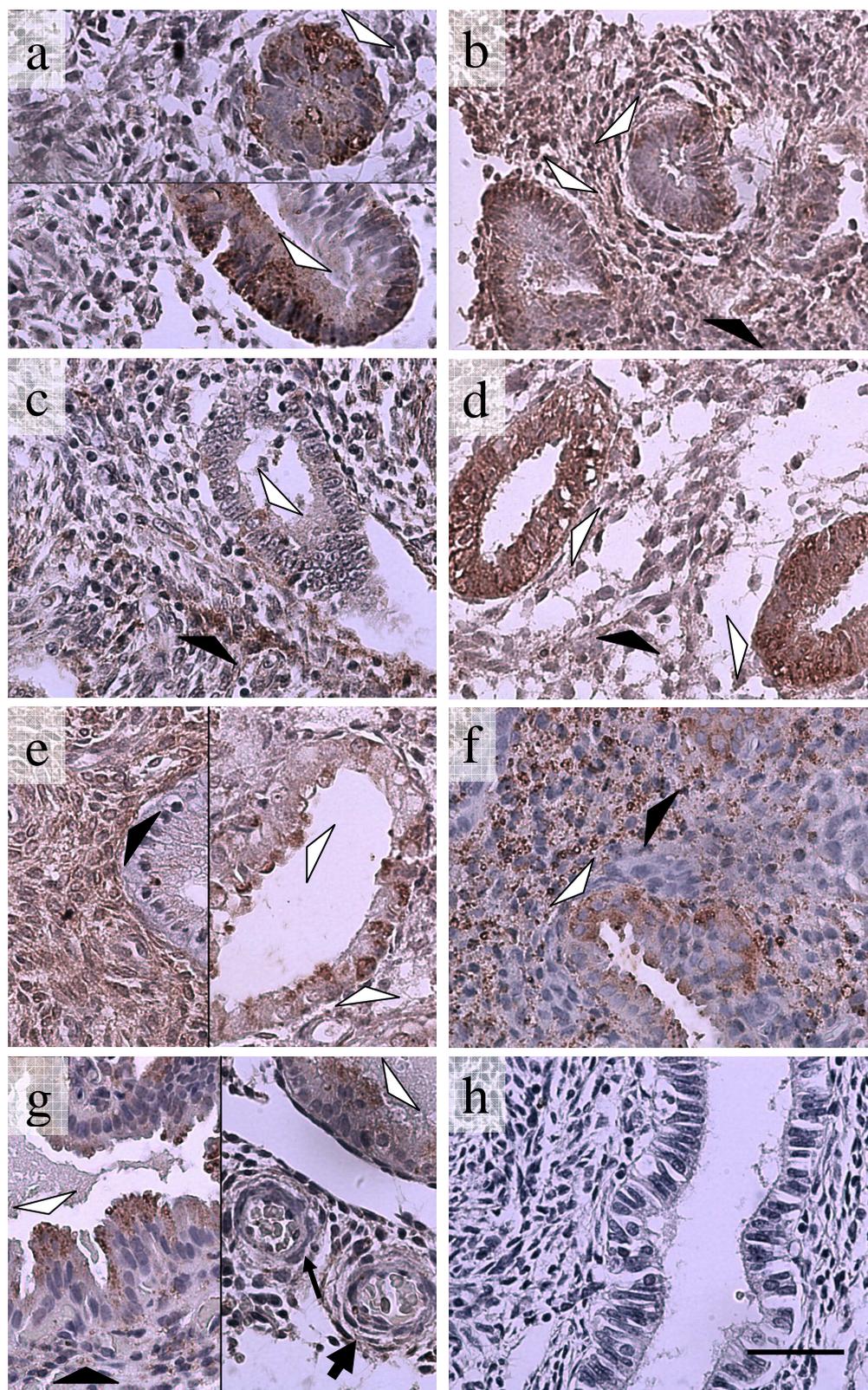


FIGURA 9 - Localização do receptor Mas no endométrio humano em diferentes fases do ciclo menstrual.

As áreas coradas em marrom indicam imunomarcção para o Mas no epitélio glandular (setas brancas) e no estroma (triângulos pretos). Alguns vasos estromais são apontados por setas pretas. **a)** proliferativo inicial; **b)** proliferativo intermediário; **c,d)** periovulatório; **e)** secretor intermediário; **f)** secretor tardio; **g)** endometriose peritoneal na fase secretora e; **h)** controle negativo. Barra = 50 μ m.

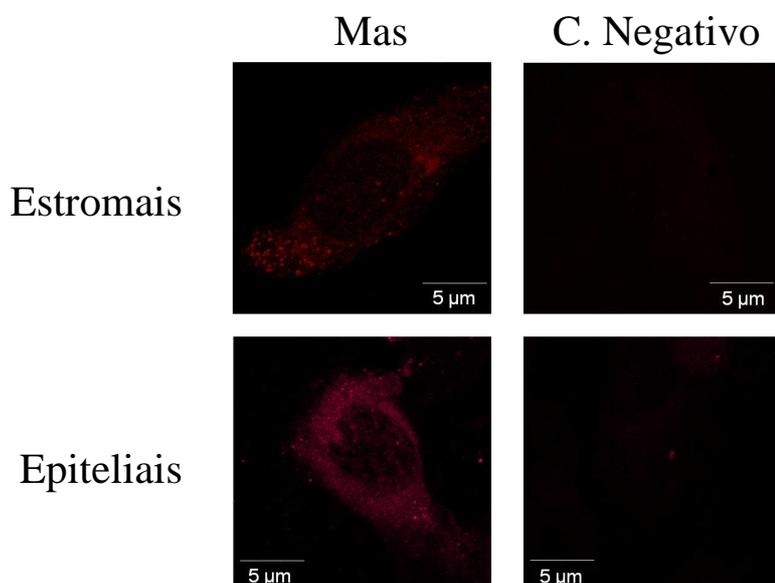


FIGURA 10 - Imunofluorescência e microscopia confocal mostrando a localização intracelular da imunomarcção para Mas em células endometriais cultivadas.

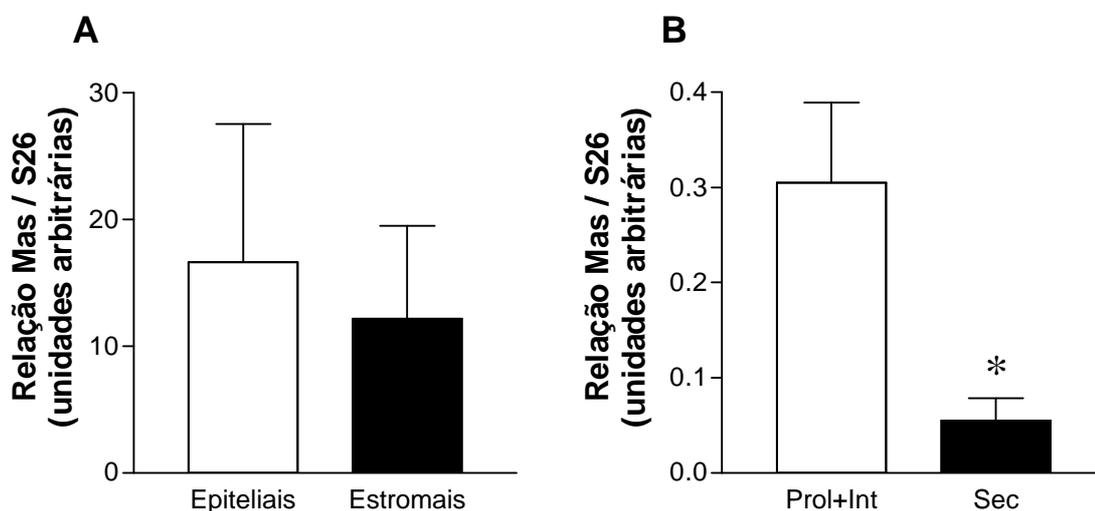


FIGURA 11 - Expressão do mRNA para o receptor Mas em células endometriais cultivadas e em amostras de tecido endometrial datadas como endométrio proliferativo ou periovulatório (Prol+Int) vs. Secretor

Os dados são expressos como média \pm erro padrão da expressão gênica corrigida de Mas corrigida para o controle interno S26. * $p < 0,05$ para comparações entre tipos celulares (teste de Wilcoxon) ou entre fases do ciclo (teste t de Student).

4.6 Resumo dos achados de imunolocalização da Ang-(1-7) e Mas no endométrio humano

A FIG. 12 apresenta um resumo esquemático da intensidade de imunocoloração para Ang-(1-7) e seu receptor Mas nas amostras endometriais obtidas em diferentes fases do ciclo menstrual.

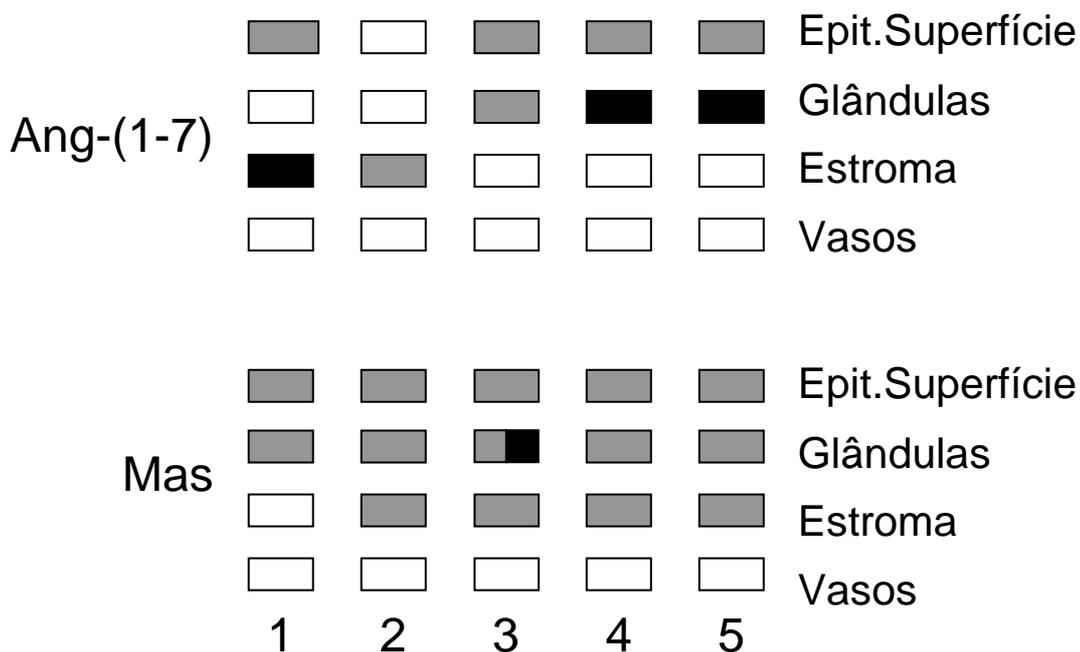


FIGURA 12 - Resumo esquemático da intensidade de imunocoloração para Ang-(1-7) e seu receptor Mas nas amostras endometriais obtidas em diferentes fases do ciclo menstrual.

1 = proliferativo inicial; 2 = proliferativo intermediário; 3 = periovulatório; 4 = secretor intermediário; 5 = secretor tardio. A intensidade de imunocoloração é representada pelas cores: branco = intensidade fraca; cinza = intensidade moderada; e preto = intensidade forte.

5 DISCUSSÃO

O sistema renina-angiotensina foi estudado, no início, principalmente pelas suas ações no sistema vascular, sendo a Ang II o principal efetor. Em alguns tecidos como o do cérebro, a existência da barreira hemato-encefálica levantava dúvidas de como alguns componentes deste sistema alcançariam determinadas regiões do órgão. Evidências foram se acumulando no sentido de que diferentes tipos de tecidos do organismo também expressam vários dos componentes do SRA e, portanto, a noção de compartimentalização do SRA foi se sedimentando (HUSAIN *et al.*, 1983). Além disto, foi constatado que essa expressão tecidual de enzimas e peptídeos do SRA é independente da que ocorre no sistema cardiovascular, seja na quantidade ou no momento, estando, portanto, subordinada à fisiologia local de cada órgão ou tecido em particular (NARUSE *et al.*, 1984; OKUIAMA *et al.*, 1988; PANDEY; MISONO; INAGAMI, 1984; PAUL; MEHR; KREUTZ, 2006I).

O endométrio é um tecido muito vascularizado, que apresenta modificações morfológicas e funcionais de maneira cíclica, sob estímulo de hormônios esteróides. Neste tecido, o conhecimento relativo ao SRA é escasso. Sabe-se que o endométrio expressa renina e que esta expressão aumenta sob estímulo da progesterona (SHAH *et al.*, 1991). Foi demonstrado também que o endométrio expressa Ang II, seus receptores AT1 e AT2 e a ECA (AHMED *et al.*, 1995; LI; AHMED, 1997; SARIDOGAN *et al.*, 1996).

No endométrio, durante a fase proliferativa, a Ang II se localiza nas células do epitélio glandular e nas células estromais, aparecendo pouco em torno dos vasos. Na fase secretora, ao contrário, foi imunolocalizada predominantemente nas células estromais perivasculares (pré-decíduais) e apresentou padrão negligível nos outros tipos celulares (AHMED *et al.*, 1995)

O receptor AT2 possui maior expressão no endométrio do que o receptor AT1 (AHMED *et al.*, 1995). O receptor AT1 foi identificado no endométrio, nas células do epitélio glandular e no endotélio vascular, com expressão negligível nas células estromais. A marcação deste receptor predomina na fase proliferativa. Foi observado crescente aumento na intensidade da

imunocoloração, da parte inicial da fase proliferativa até o periovulatório (SARIDOGAN *et al.*, 1996).

A ECA foi descrita e avaliada no endométrio por técnica de *western blot* e imunistoquímica, com expressão maior no endométrio menstrual e na parte média e final da fase secretora. A imunistoquímica localizou a ECA nas células epiteliais glandulares e nas células endoteliais e menor expressão nas células estromais (LI; AHMED, 1997).

O acúmulo de evidências de que a Ang-(1-7) é um peptídeo ativo, que se acopla ao receptor Mas e apresenta a maioria dos seus efeitos de forma antagonista aos da Ang II e a descoberta da ECA2 fizeram com que os estudos relacionados ao SRA se ampliassem nas duas últimas décadas para além do foco da fisiopatologia da hipertensão arterial.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a presença e a localização da Ang-(1-7), do receptor Mas e da ECA tipo 2 no endométrio humano, um tecido dinâmico, devido à influência de hormônios esteróides e constituído de tipos celulares diversos. Além disso, é a primeira vez que se demonstram a presença e a localização da Ang-(1-7) e a expressão do receptor Mas e da ECA2 no endométrio humano.

A expressão gênica da ECA2 e do receptor Mas foi avaliada por meio da PCR em tempo real. O método apresenta ótima sensibilidade e reprodutibilidade. Os três pares de oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados de forma a inibir a amplificação de possível DNA genômico contaminante. Como referência comparativa, foi utilizada no controle interno a expressão do gene da proteína ribossomal S26, de expressão constitutiva que não sofre variação na expressão sob diversas condições (VINCENT; MARTY; FORT, 1993). As amostras foram aferidas em duplicatas e extraídas as médias dos valores obtidos.

A ECA tipo2, uma enzima homóloga à ECA, foi estudada em células epiteliais e estromais cultivadas. O mRNA foi detectado nos dois tipos celulares, mas aparece em maior quantidade (duas vezes mais) nas células epiteliais do que nas estromais e tem expressão 6,6 vezes maior na fase secretora do que na fase proliferativa.

A expressão do receptor Mas no material analisado não apresentou diferença significativa quando foram comparadas as células epiteliais com as

células estromais. Também não houve diferença significativa na expressão do Mas entre a fase proliferativa e a fase secretora do endométrio. É interessante relatar que foi verificado, em experimento recente, que o receptor Mas pode formar um complexo hetero-oligomérico com o receptor AT1 da Ang II, inibindo as ações deste peptídeo (KOSTENIS *et al.*, 2005).

Apesar do método utilizado para avaliar a expressão gênica ser um processo automatizado, bastante sensível, e as reações se processarem em um ambiente fechado, foram tomados cuidados de estringência técnica referentes ao manuseio dos materiais utilizados. Foram também realizadas curvas de diluição e curvas de dissociação, no intuito de se avaliarem possíveis desvios no método. Os amplicons produzidos na reação de RT-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e aferidos com um marcador de pares de base, também com o objetivo de conferir os resultados obtidos no processo.

O método utilizado para a localização do heptapeptídeo foi a imunistoquímica, um método que apresenta grande especificidade. Sendo a Ang-(1-7) um peptídeo formado no metabolismo intermediário das células, os métodos de biologia molecular obviamente não se prestam ao seu estudo. Uma limitação da imunistoquímica é que este método não diferencia entre o peptídeo ligado ao receptor e o peptídeo livre, nem atesta a sua origem.

A imunolocalização da Ang-(1-7) mostrou marcação intensa nas células epiteliais glandulares na parte média e final da fase secretora, em contraste com as amostras da fase proliferativa, na qual a marcação foi fraca a moderada. Nas células epiteliais superficiais, a imunocoloração apresentou intensidade moderada tanto na fase proliferativa quanto na fase secretora. Nas células estromais, a imunocoloração foi moderada a intensa na parte inicial da fase proliferativa e fraca marcação na fase secretora.

Foi descrito anteriormente que a Ang II, considerado um efector multifuncional do SRA, foi detectada principalmente nas células epiteliais glandulares e estromais durante a fase proliferativa do endométrio (AHMED *et al.*, 1995). Relevante é a presença desse peptídeo na fase de crescimento do endométrio, dado seu efeito mitogênico e angiogênico (ANDRADE *et al.*, 1996; BAKER; ACETO, 1990; DAEMEN *et al.*, 1991; FERNADEZ; TWICKLER; MEAD, 1985; LE NOBLE *et al.*, 1991; MACHADO; SANTOS; ANDRADE, 1999), contrastando com os achados deste trabalho, em que a Ang-(1-7), sabidamente

um peptídeo com efeito anti-proliferativo e anti-angiogênico, predominou na fase secretora, quando o endométrio não tem crescimento expressivo e possui certa estabilidade morfológica. Encontrou-se também uma marcação importante da Ang-(1-7) na fase inicial da fase proliferativa, quando o endométrio não tem, ainda, crescimento expressivo.

É interessante notar que a imunocoloração das estruturas microvasculares do endométrio exibiram marcação fraca para a Ang-(1-7), em contraste com a importância dada a este peptídeo no sistema cardiovascular, relativas ao seu efeito vasodilatador. A Ang II também não é encontrada nas estruturas microvasculares e sim nas células estromais perivasculares na fase secretora, podendo atuar nesses vasos de forma parácrina (AHMED *et al.*, 1995).

A Ang-(1-7) é capaz de liberar prostaglandina, assim como a Ang II (HILCHEY; BELL-QUILLEY, 1995; IYER *et al.*, 2000; JAISWAL *et al.*, 1992; TALLANT; CLARK, 2003). Investigações relacionadas com a transdução do sinal da Ang-(1-7) e Ang II, em células do músculo liso da aorta de coelho, demonstraram a liberação de ácido aracdônico pelos dois peptídeos, só que a produção de 6-keto PGF α , um metabólito estável da prostaciclina, foi muito maior com a estimulação ocorrendo com Ang-(1-7).

Verificou-se, também, que o heptapeptídeo, a partir da estimulação do íon Ca $^{++}$ e MAP kinase (MAPK), produz a translocação da fosfolipase A 2 (PLA 2) do citoplasma para o envelope nuclear, estimulando a síntese de prostaglandina (MUTHALIF *et al.*, 1998). A prostaciclina possui, além de efeito vasodilatador, também inibição na síntese de DNA, reduzindo a proliferação celular (MORISAKI *et al.*, 1988), assim como outras prostaglandinas (NILSSON; OLSSON, 1984). Vale lembrar aqui que, na parte média da fase secretora do endométrio, ocorre um edema nesse tecido, possivelmente mediado por prostaglandinas.

Outra substância que também inibe a proliferação celular e apresenta efeito vasodilatador é o óxido nítrico, uma substância muito estudada no endotélio e na musculatura lisa vascular (FARHY *et al.*, 1993; GARG; HASSID, 1989; ZUCKERBRAUM *et al.*, 2007). É sabido que a Ang-(1-7) também libera óxido nítrico (BROSNIHAN, 1998; BROSNIHAN; LI; FERRARIO, 1996; HEITSCH *et al.*, 2001; PÖRSTI *et al.*, 1994; SAMPAIO *et al.*, 2007a), sendo este um dos mecanismos que explicam o seu efeito vasodilatador. O endométrio expressa tanto prostaglandinas quanto óxido nítrico. As duas isoformas da enzima óxido

nítrico sintase, uma constitutiva e a outra induzível, são expressas principalmente pelas células do epitélio glandular, sendo que a expressão é nitidamente preponderante na fase secretora do endométrio (KHORRAM; GARTHWAITE; MAGNESS, 1999; TSCHUGGUEL *et al.*, 1999; TSENG *et al.*, 1996).

A Ang-(1-7) nitidamente inibe, mesmo que parcialmente, mecanismos de proliferação celular, como demonstrado em células de músculo liso vascular, no endotélio e em cultura de células neoplásicas (GALLAGHER; TALLANT, 2004; MENON *et al.*, 2007; STRAWN; FERRARIO; TALLANT, 1999; TALLANT; CLARK, 2003; TALLANT; FERRARIO; GALLAGHER, 2005). A inibição da Ang-(1-7) sobre a Ang II é devida, em parte, à interferência na via ERK1/2 (SAMPAIO *et al.*, 2007b; ZHU *et al.*, 2002), sendo possível também um aumento do cAMP, levando à redução na atividade da MAPK. Estas ações contrabalançam os estímulos produzidos pela Ang II.

O estrogênio se relaciona com fatores de crescimento celular (NELSON *et al.*, 1991). No tecido endometrial, o estímulo estrogênico produz proliferação celular. Outros fatores de crescimento e seus receptores também já foram descritos no endométrio, como o VEGF, o FGF e EGF (MÖLLER *et al.*, 2001; SANGHA *et al.*, 1997), sendo alguns destes, agonistas dos receptores tirosino-kinase (ÉTIENNE; MILLOT, 2003), que atuam na via ERK1/2, via esta que pode sofrer inibição por ação da Ang-(1-7).

A progesterona, por sua vez, produz no endométrio uma inibição da proliferação celular, sendo alguns desses mecanismos, a diminuição da expressão dos receptores estrogênicos nos núcleos celulares (CLARKE; SUTHERLAND, 1990; HSUEH; PECK; CLARK, 1976; OKULICZ; BALSAMO; TAST, 1993) e a conversão do 17 β -estradiol em sulfato de estrona, que é rapidamente excretado da célula (TSENG; GURPID, 1975). É possível que existam outros mecanismos deflagrados pela progesterona na fase secretora do endométrio, para inibir a proliferação e estabilizar o tecido após a ovulação, mantendo-o apto à nidadação. Foi demonstrado, neste trabalho, que a ECA tipo2, enzima que converte a Ang II em Ang-(1-7), apresenta expressão 6,6 vezes maior na fase secretora do que na fase proliferativa. É possível, portanto, que a progesterona ative a expressão do gene dessa enzima, que atuará degradando a Ang II, um fator que ativa a proliferação celular, produzindo, por outro lado, um efector que iniba também vias mitogênicas, como é o caso da Ang-(1-7).

Tem-se, então, que a Ang II se expressa mais na fase proliferativa e a Ang-(1-7) mais na fase secretora. Esta idéia sugere um equilíbrio no que tange à proliferação celular, um contraponto entre os dois peptídeos, como ocorre entre o estrogênio e a progesterona. Seria plausível, portanto, sugerir, para estudos futuros, experimentos que venham a corroborar a idéia de que a Ang-(1-7) poderia ser um efetor da progesterona na inibição do crescimento celular endometrial, seja através da prostaciclina ou do óxido nítrico ou de ambos.

Os resultados deste trabalho vieram contribuir para a complementação do conhecimento relacionado ao SRA no endométrio e sugerem a existência de um sistema tecidual, tendo sido demonstrada pela primeira vez a presença e localização espaço-temporal da Ang-(1-7), do Mas e da ECA tipo2. É possível que essa ampliação do conhecimento sobre o SRA nesse tecido venha a contribuir com áreas do conhecimento como a contracepção ou o tratamento das hiperplasias e neoplasias endometriais.

6 CONCLUSÕES

- O peptídeo vasoativo Ang-(1-7), a enzima envolvida na sua síntese e seu receptor Mas são expressos no endométrio humano em todas as fases do ciclo menstrual.
- A expressão do receptor Mas não apresentou diferença significativa entre as células epiteliais e estromais, nem entre a fase proliferativa e a fase secretora do endométrio humano. A expressão de Ang-(1-7) no endométrio humano aumenta na fase secretora do ciclo menstrual.
- A expressão da enzima conversora de angiotensina tipo 2 é duas vezes maior nas células epiteliais do que nas células estromais e é 6,6 vezes maior na fase secretora do que na fase proliferativa.

REFERÊNCIAS

AHMED, A. *et al.* Localization of the angiotensin II and its receptor subtype expression in human endometrium and identification of a novel high-affinity angiotensin II binding site. **J Clin Invest**, v.96: p.848-857, 1995.

ALENINA, N. *et al.* Cell type-specific expression of the Mas proto-oncogene in testis. **J Histochem Cytochem**, v.50, n.5: p.691-6, May 2002.

AMBROZ, C.; CLARK, A.J.L.; CATT, K.J. The Mas oncogene enhances angiotensin-induced $[Ca^{2+}]_i$ responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors. **Biochim Biophys Acta**, v.1133: p.107-111, 1991.

ANDRADE, S.P. *et al.* Angiotensin-II-induced angiogenesis in sponge implants in mice. **Int J Microcirc Clin Exp**, v.16: p.302-307, 1996.

BAKER, K.M.; ACETO, J.F. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.259: p.H610-H618, 0363-6135/90, 1990.

BENEDETTO, M.T.; TABANELLI, S.; GURPIDE, E. Estrone sulfate sulfatase activity is increased during *in vitro* decidualization of stromal cells from human endometrium. **J Clin Endocrinol Metab**, v.70: p.342-345, 1990.

BERRY, C. *et al.* Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.281, n.6: p.H2337-65, Dec 2001.

BLOCK, C.H. *et al.* Immunocytochemical localization of angiotensin (1-7) in the rat forebrain. **Peptides**, v.9: p.1395-1401, 1988.

BOTELHO, L.M.O. *et al.* Plasma angiotensin-(1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. **Peptides**, v.15;4: pp.723-729, 1994.

BRAUN-MENENDEZ, E. *et al.* The substance causing renal hypertension. **J Physiol**, v.98: p.283-298, 1940.

BROSNIHAN, K.B. Effect of the angiotensin-(1-7) peptide on nitric oxide release. **Am J Cardiol**, v.82: p.17S-19S, 1998.

BROSNIHAN, K.B.; LI, P.; FERRARIO, C. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. **Hypertension**, v.27: p.523-528, 1996.

BUCZKO, W.; KUCHARWICZ, I. Angiotensin-(1-7). One step forward? **Pol J Pharmacol**, v.52, n.2: p.75-81, Mar-Apr 2000.

BUNNEMANN, B. *et al.* Autoradiographic localization of Mas proto-oncogene mRNA in adult rat brain using in situ hybridization. **Neuroscience Letters**, v.114: p.147-153, 1990.

CAMPBELL, D.J. Circulating and tissue angiotensin systems. **J Clin Invest**, v.79, n.1: p.1-6, jan 1987.

CAMPBELL, D.J.; HABENER, J.F. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. **J Clin Invest**, v.78, n.1: p.31-39, Jul 1986.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. *et al.* Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. **Am J Physiol**, v.257: p.H324-H329, 1989.

CHAPPELL, M.C. *et al.* Conversion of angiotensin I to angiotensin-(1-7) by thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15) in vascular smooth muscle cells. **J Vasc Med Biol**, v.5: p.129-137, 1994.

CHAPPELL, M.C. *et al.* Identification of angiotensin-(1-7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. **J Biol Chem**, v.264: p.16518-16523, 1989.

CHAPPELL, M.C. *et al.* Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. **Hypertension**, v.31, n.1 Pt 2: p.362-7, Jan 1998.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, v.162: p.156-9, 1987.

CLARKE, C.L.; SUTHERLAND, R.L. Progesterone regulation of cellular proliferation. **Endocr Rev**. v.11, n.2: p.266-301, May 1990.

CLARK, M.A. *et al.* Angiotensin-(1-7) reduces renal angiotensin II receptors through a cyclooxygenase-dependent mechanism. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.41: p.276-283, 2003.

COSTA, A.P.R. *et al.* Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. **Endocrinology**, v.144: p.1942-1948, 2003.

COSTA-GONÇALVES, A.C. *et al.* Evidence that the vasodilator angiotensin-(1-7)-Mas axis plays an important role in erectile function. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, Epub 2007 Jul 6, v.293, n.4: p.H2588-96, Oct 2007.

DAEMEN, M.J. *et al.* Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. **Circ Res**, v.68, n.2: p.450-456, Feb 1991.

DIMMELER, S. *et al.* Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. **Circ Res**, v.81: p.970-976, 1997.

DONOGHUE, M. *et al.* A novel angiotensin converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin-(1-9). **Circ Res**, v.87: p.E1-E9, 2000.

DZAU, V.J. *et al.* Tissue-specific regulation of renin expression in the mouse. **Hypertension**, v.9, n.6 Pt 2: p.III36-41, Jun 1987a.

DZAU, V.J. *et al.* Characterization of purified rabbit uterine renin: influence of pregnancy on uterine inactive renin. **Endocrinology**, v.120: p.358-364, Copyright, 1987b.

EHLERS, M.R.; RIORDAN, J.F. Angiotensin-converting enzyme: new concepts concerning its biological role. **Biochemistry**, v.27;28, n.13: p.5311-5318, Jun 1989.

ENDERS, A.C. Current topic: structural responses of the primate endometrium to implantation. **Placenta**, v.12: p.309-325, 1991.

ERDÖS, E.G. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years: Lewis K. Dahl memorial lecture. **Hypertension**, v.16: p.363-370, 1990.

ÉTIENNE, J.; MILLOT, F. **Bioquímica Genética e Biología Molecular**. 6^a ed. Santos, 2003.

FARHY, D.R. *et al.* Role of kinins and nitric oxide in the effects of ACE inhibition on neointima formation. **Circ Res**, v.72: p.1202-1210, 1993.

FAZLEABAS, A.T. *et al.* Modulation of the baboon (*Papio anubis*) uterine endometrium by chorionic gonadotrophin during the period of uterine receptivity. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.2; n.96(5): p.2543-8, Mar 1999.

FAZLEABAS, A.T.; STRAKOVA, Z. Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment. **Mol Cell Endocrinol**, v.186, Issue 2: p.143-147, Jan 2002.

FERENCZY, A. Studies on the cytodynamics of human endometrial regeneration. II. Transmission electron microscopy and histochemistry. **Am J Obstet Gynecol**, v.124: p.582-95, 1976.

FERNANDEZ, L.A.; TWICKLER, J.; MEAD, A. Neovascularization produced by angiotensin II. **J Lab Clin Med**, v.105, n.2: p.141-5, 1985.

FERRARIO, C.M. Commentary on Tikellis *et al.*: there is more to discover about angiotensin-converting enzyme. **Hypertension**, v.41: p.390-391, Mar 2003.

FERRARIO, C.M. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. **Hypertension**, v.47:p.515-521, 2006.

FERRARIO, C.M. *et al.* A hypothesis regarding the function of angiotensin peptides in the brain. **Clin Exp Hypertens**, v.10, Suppl 1: p.107-21, 1988.

FERRARIO, C.M. *et al.* Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v.30: p.535-541, 1997.

FERRARIO, C.M. *et al.* Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function and natriuresis. **J Am Soc Nephrol**, v.9: p.1716–1722, 1998.

FERRARIO, C.M.; IYER, S.N. Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. **Regul Peptides**, v.78, n.1: pp.13-18(6), Nov 1998.

FERREIRA, M.C; WITZ, C.A.; HAMMES, L.S.; KIRMA, N.; PETRAGLIA, F.; SCHENKEN, R.S.; REIS, F.M. Activin A increases invasiveness of endometrial cells in an in-vitro model of human peritoneum. **Mol Hum Reprod** 2008, Epub Apr 19.

FERREIRA, S.H. Bradykinin-potentiating factor (bpf) present in the venom of Bothrops jararaca. **Br J Pharmacol Chemother**, v.24: p.163-9, 1965.

FERRIS, T.F.; GORDEN, P.; MULROW, P.J. Rabbit uterus as a source of renin. **Am J Physiol**, v.212, n.3: p.698-702, Mar 1967.

FITZSIMONS, J.T. The effect on drinking of peptide precursors and of shorter chain peptide fragments of angiotensin II injected into the rat's diencephalon. **J Physiol**, v.214, n.2: p.295–303, Apr 1971.

FONTES, M.A.P. *et al.* Evidence that angiotensin-(1-7) plays a role in the central control of blood pressure at the ventrolateral medulla acting through specific receptors. **Brain Res**, v.665: p.175-180, 1999.

FREEMAN, E.J. *et al.* Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. **Hypertension**, v.28: p.104-108, 1996.

GARG, U.C.; HASSID, A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. **J Clin Invest**, v.83: p.1774-1777, 1989.

GASPARO, M. *et al.* International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacol Rev**, v.52: p.415-472, Sep 2000.

GALLAGHER, P.E. *et al.* Distinct roles for ANG II and ANG-(1-7) in the regulation of angiotensin-converting enzyme 2 in rat astrocytes. **Am J Physiol Cell Physiol**, Epub 2005 Sep 21, v.290, n.2: p.C420-6, Feb 2006.

GALLAGHER, P.E.; TALLANT, E.A. Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7). **Carcinogenesis**, Epub 2004 Jul 29, v.25, n.11: p.2045-52, Nov 2004.

GIANI, J.F. *et al.* Angiotensin-(1 7) stimulates the phosphorylation of JAK2, IRS-1 and Akt in rat heart in vivo: role of the AT1 and Mas receptors. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, Epub 2007 May 11, v.293, n.2: p.H1154-63, Aug 2007.

GIBSON, U.E.M.; HEID, C.A.; WILLIAMS, P.M. A novel method for real-time quantitative RT-PCR. **Genome Res**, v.6: p.995-1001, 1999.

GLASSER, S.R. *et al.* **The endometrium**. 1^a ed, Taylor & Francis, London, 2000.

GOLDENBERG, I. *et al.* Angiotensin II-induced apoptosis in rat cardiomyocyte culture: a possible role of AT1 and AT2 receptors. **J Hypertens**, v.19: p.1681-9, 2001.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8^a ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991.

GRAHAM, J.D.; CLARKE, C.L. Physiological action of progesterone in target tissues. **Endocr Rev**. v.18, n.4: p.502-19. Review. Aug 1997.

GRIENDLING, K.K. *et al.* Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle new concepts. **Hypertension**, v.29: p.366, 1997.

HACKENTHAL, E. *et al.* Renin in the uterus of non-pregnant mice. Immunocytochemical, ultrastructural and biochemical studies. **Histochemistry**, v.66, n.3: p.229-38, 1980.

HAGEMANN, A.; NIELSEN, A.H.; POULSEN, K. The uteroplacental renin-angiotensin system: a review. **Exp Clin Endocrinol**, v.102, n.3: p.252-61. Review, 1994.

HALBE, H.W. **Tratado de Ginecologia**. 2^a ed. São Paulo: Roca, v.1, 1993.

HANLEY, M.R. *et al.* The Mas oncogene as a neural peptide receptor: expression, regulation, and mechanism of action. **Ciba Foundation Symposiums**, v.150: p.23-46, 1990.

HEITSCH, H. *et al.* Angiotensin-(1-7) stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells. **Hypertension**, v.37, n.1: p.72-76, Jan 2001.

HILCHEY, S.D.; BELL-QUILLEY, C.P. Association between the natriuretic action of Ang-(1-7) and selective stimulation of renal prostaglandin I₂ release. **Hypertension**, v.25: p.1238-1244, 1995.

HSUEH, A.J.; PECK JR, E.J.; CLARK, J.H. Control of uterine estrogen receptor levels by progesterone. **Endocrinology**, v.98, n.2: p.438-444, Feb 1976.

HSUEH, W.A. Renin in the female reproductive system. **Cardiovasc Drugs Ther**, v.2, n.4: p.473-477, 1988.

HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am J Clin Pathol**, v.75, n.5: p.734-8, May 1981.

HUSAIN, A. *et al.* Evidence for the existence of a family of biologically active angiotensin I-like peptides in the dog central nervous system. **Circ Res**, v.52, n.4: p.460-4, Apr 1983.

IYER, S.N. *et al.* Evidence that prostaglandins mediate the antihypertensive actions of angiotensin-(1-7) during chronic blockade of the renin-angiotensin system. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.36: p.109-117, 2000.

JABBOUR, H.N. *et al.* Endocrine regulation of menstruation. **Endocr Rev**. 2006 Feb; v.27, n.1: p.17-46. Epub, Sep 13, 2005.

JACKMAN, H.L. *et al.* Angiotensin 1-9 and 1-7 release in human heart: role of cathepsin A. **Hypertension**, v.39: p.976, 2002.

JACKSON, T.R. *et al.* The Mas oncogene encodes an angiotensin receptor. **Nature**, v.335: p.437-440, 1988.

JAISSWAL, N. *et al.* Stimulation of endothelial cell prostaglandin production by angiotensin peptides: characterization of the receptor. **Hypertension**, v.19: p.1149-1155, 1992.

KHORRAM, O.; GARTHWAITE, M.; MAGNESS, R.R. Endometrial and myometrial expression of nitric oxide synthase isoforms in pre- and postmenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab**, v.84, n.6: p.2226-32, Jun 1999.

KING, W.J.; GREENE, G.L. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. **Nature**, v.307, n.5953: p.745-747, 1984.

KIRKLAND, J.L.; MURTHY, L.; STANCEL, G.M. Progesterone inhibits the estrogen-induced expression of c-fos messenger ribonucleic acid in the uterus. **Endocrinology**, v.130, n.6: p.3223-30, Jun 1992.

KOHARA, K.; BROSNIHAN, K.B.; FERRARIO, C.M. Angiotensin(1-7) in the spontaneously hypertensive rat. **Peptides**, v.14, n.5: p.883-91, Sep/Oct 1993.

KOSTENIS, E. *et al.* G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. **Circulation**, v.111: p.1806-1813, 2005.

LANGEVELD, B. *et al.* Angiotensin-(1-7) attenuates neointimal formation after stent implantation in the rat. **Hypertension**, v.45: p.138, 2005.

LEHNINGER, A.L. **Principios de Bioquímica**. 3ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LE NOBLE, F.A. *et al.* Angiotensin II stimulates angiogenesis in the chorio-allantoic membrane of the chick embryo. **Eur J Pharmacol**, v.26;195, n.2: p.305-6, Mar 1991.

LI, C. *et al.* Definitive molecular evidence of renin–angiotensin system in human uterine decidual cells. **Hypertension**, v.36: p.159–64, 2000.

LI, P. *et al.* Angiotensin-(1–7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. **Hypertension**, v.29: p.394-400, 1997.

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.402-408, 2001.

LI, X.F.; AHMED, A. Compartmentalization and cyclic variation of immunoreactivity of renin and angiotensin converting enzyme in human endometrium throughout the menstrual cycle. **Hum Reprod**, v.12: p.2804-2809, 1997.

LODISH, H. *et al.* **Biologia celular e molecular**. 5^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LUCIDI, R.S. *et al.* A novel in vitro model of the early endometriotic lesion demonstrates that attachment of endometrial cells to mesothelial cells is dependent on the source of endometrial cells. **Fertil Steril**, v.84: p.16-21, 2005.

LUDWIG, H.; SPORNITZ, U.M. Microarchitecture of the human endometrium by scanning electron microscopy: menstrual desquamation and remodelling. **Ann N Y Acad Sci**. v.622: p.28-46, 1991.

MACHADO, R.D.P.; SANTOS, R.A.S.; ANDRADE, S.P. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. **Life Sci**, v.66: p.67-76, 1999.

MENON, J. *et al.* Angiotensin-(1-7) inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenografts in nude mice through a reduction in cyclooxygenase-2. **Cancer Res**, v.15;67, n.6: p.2809-15, Mar 2007.

METZGER, R. *et al.* Expression of the mouse rat mas protooncogene in the brain and peripheral tissues. **FEBS Lett**, v.357: p.27-32, 1995.

MÖLLER, B. *et al.* Expression of the angiogenic growth factors VEGF, FGF-2, EGF and their receptors in normal human endometrium during the menstrual cycle. **Mol Human Reprod**, v.7: p.65-72, 2001.

MORISAKI, N. *et al.* Cell cycle-dependente inhibition of DNA synthesis by prostaglandin I₂ in cultured rabbit aortic smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, v.71, n.2-3: p.165-71, 1988.

MUTHALIF, M.M. *et al.* Signal transduction mechanisms involved in angiotensin-(1-7)-stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells. **J Pharmacol Exp Ther**, v.284: p.388–398, 1998.

MYLONAS, I. *et al.* Immunohistochemical analysis of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and progesterone receptor in normal human endometrium. **Acta Histochem**, v.106, n.3: p.245-52, 2004.

NARDO, L. G. *et al.* Pinopode expression during human implantation. **Eur J Obst Gynecol Reprod Biol**, v. 101, n.2: p. 104-108.

NARUSE, M. *et al.* Gonadotropin-dependent renin in rat testes. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.177, n.2: p.337-342, 1984.

NELSON, K. *et al.* Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.88: p.21-25, 1991.

NILSSON, J.; OLSSON, A.G. Prostaglandin E₁ inhibits DNA synthesis in arterial smooth muscle cells stimulated with platelet-derived growth factor. **Atherosclerosis**, v.53: p.77-82, 1984.

NOYES, R.W.; HERTIG, A.T.; ROCK, J. Dating the endometrial biopsy. **Fertil Steril**, v.1: p.3-25, 1950.

OKULICZ, W.C.; BALSAMO, M.; TAST, J. Progesterone regulation of endometrial estrogen receptor and cell proliferation during the late proliferative and secretory phase in artificial menstrual cycles in the rhesus monkey. **Biol Reprod**, v.49: p.24-32, 1993.

OKUYAMA, A. *et al.* Induction of renin-angiotensin system in human testis in vivo. **Arch Androl**, v.21: p.29-35, 1988.

PAGE, I.H.; HELMER, O.M. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. **J Exp Med**, v.71, n.1: p.29-42, 1940.

PANDEY, K.N.; MISONO, K.S.; INAGAMI, T. Evidence for intracellular formation of angiotensins: coexistence of renin and angiotensin-converting enzyme in Leydig cells of rat testis. **Biochem Biophys Res Commun**, v.16, n.122(3): p.1337-43, Aug 1984.

PAUL, M.; MEHR, A.P.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiol Rev**, v.86, n.3: p.747-803, Jul 2006.

PAULA, R.D. *et al.* Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. **Hypertension**, v.26, n.6 Pt 2: p.1154-9, Dec 1995.

PEREIRA, V. *et al.* Immunolocalization of angiotensin-(1-7)/Mas receptor and angiotensin II in the rat ovary. The society for the study of reproduction **38th Annual Meeting**: p.24-27, Quebec City, Quebec, Canada, July 2005.

PNG, F.Y.; MURPHY, C.R. Cytoskeletal proteins in uterine epithelial cells only partially return to the pre-receptive state after the period of receptivity. **Acta Histochem**, v.104, n.3: p.235-244, 2002.

PÖRSTI, I. *et al.* Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. **Br J Pharmacol**, v.111: p.652-654, 1994.

PRESS, M.F.; GREENE, G.L. Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progestin receptor. **Endocrinology**, v.122, n.3: p.1165-75, Mar 1988.

PUCCELL, A.G.; BUMPUS, F.M.; HUSAIN, A. Rat ovarian angiotensin II receptors. Characterization and coupling to estrogen secretion. **J Biol Chem**, v.25;262, n.15: p.7076-7080, May 1987.

SAMPAIO, W.O. *et al.* Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. **Hypertension**, Epub 2006 Nov 20, v.49, n.1: p.185-92. Jan 2007a.

SAMPAIO, W.O. *et al.* Angiotensin-(1-7) counterregulates Angiotensin II signaling in human endothelial cells. **Hypertension**, Epub 2007 Nov 5, v.50, n.6: p.1093-8, Dec 2007b.

SANGHA, R.K. *et al.* Fibroblast growth factor receptor-1 is a critical component for endometrial remodeling: localization and expression of basic fibroblast growth factor and FGF-R1 in human endometrium during the menstrual cycle and decreased FGF-R1 expression in menorrhagia. **Lab Invest**, v.77: p.389-402, 1997.

SANTOS, R.A.S. *et al.* Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.100: p.8258-8263, 2003.

SANTOS, R.A.S. *et al.* Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. **Brain Res Bull**, v.35: p.293-298, 1994.

SANTOS, R.A.S. *et al.* Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in dog brainstem. **Hypertension**, v.11: p.1153-7, 1988.

SANTOS, R.A.S. *et al.* Evidence for a physiological role of angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. **Hypertension**, v.27: p.875-884, 1996.

SANTOS, R.A.S. *et al.* Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium. **Hypertension**, v.19 (Suppl II): p.II-56-II-61, 1992.

SANTOS, R.A.S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). **Br J Med Biol Res**, v.27: p.1033-1047, 1994.

SARIDOGAN, E. *et al.* Type 1 angiotensin II receptors in human endometrium. **Mol Hum Reprod**, v.2: p.659-664, 1996.

SCHIAVONE, M.T. *et al.* Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.85, n.11: p.4095-8, Jun 1988.

SHAH, D.M. *et al.* Effect of progesterone on renin secretion in endometrial stromal, chorionic trophoblast, and mesenchymal monolayer cultures. **Am J Obstet Gyneco**, v.164, n.4: p.1145-1150, Apr 1991.

SHAW, K.J. *et al.* Human decidua is a major source of renin. **J Clin Invest**, v.83: p.2085-2092, 1989.

SIMÕES E SILVA, A.C. *et al.* The renin angiotensin system in childhood hypertension: selective increase of angiotensin-(1-7) in essential hypertension. **J Pediatr**, v.145, n.1: p.93-8, Jul 2004.

SOUBRIER, F.; CORVOL, P. Clinical implications of the molecular biology of the renin-angiotensin system. **Eur Heart J**, v.11 Suppl D:3-10. Review, May 2000.

SPEROFF, I.; FRITZ, M.A. **Clinical gynecology endocrinology and infertility**. 7^a ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

SQUIRES, P.M.; KENNEDY, T.G. Evidence for a role for a uterine renin-angiotensin system in decidualization in rats. **J Reprod Fertil**, v.95, n.3: p.791-802, Aug 1992.

SRISUPARP, S.; STRAKOVA, Z.; FAZLEABAS, A.T. The role of chorionic gonadotropin (CG) in blastocyst implantation. **Arch Med Res**, v.32, n.6: p.627-634(8), Nov 2001.

STRAKOVA, Z.; SRISUPARD, S.; FAZLEABAS, A.T. IL-1 β during in vitro decidualization in primate. **J Reprod Immunol**, v.55, Issue 1-2: p.35-47, 2002.

STRAWN, W.B.; FERRARIO, C.M.; TALLANT, E.A. Angiotensin-(1-7) reduces smooth muscle growth after vascular injury. **Hypertension**, v.33, pt. 2: p.207-211, 1999.

TALLANT, E.A.; CLARK, M.A. Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). **Hypertension**, Epub 2003 Sep 2, v.42, n.4: p.574-9, Oct 2003.

TALLANT, E.A.; DIZ, D.I.; FERRARIO, C.M. State-of-the-Art lecture. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle. **Hypertension**, v.34, n.4 Pt 2: p.950-7, Oct 1999.

TALLANT, E.A.; FERRARIO, C.; GALLAGHER, P.E. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the Mas receptor. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, Epub 2005 Jun 10, v.289, n.4: p.H1560-6, Oct 2005.

TIGERSTEDT, R.; BERGMAN, P.G. Niere und Kreislauf. **Scandinav Arch J Physiol**, v.8: p.223, 1898.

TIPNIS, S.R. *et al.* A human homolog of angiotensin-converting enzyme: cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **J Biol Chem**, v.275: p.33238-33243, 2000.

TONNAER, J.A. *et al.* Proteolytic conversion of angiotensins in rat brain tissue. **Eur J Biochem**, v.15, n.131(2): p.415-21, Mar 1983.

TRASK, A.J.; FERRARIO, C.M. Angiotensin-(1-7): pharmacology and new perspectives in cardiovascular treatments. **Cardiovasc Drug Rev**, v.25, n.2, pp.162-174(13), Summer 2007.

TSCHUGGUEL, W. *et al.* Elevation of inducible nitric oxide synthase activity in human endometrium during menstruation. **Biol Reprod**, v.60, n.2: p.297-304, Feb 1999.

TSENG, L. *et al.* Cyclic expression of endothelial nitric oxide synthase mRNA in the epithelial gland human endometrium. **J Soc Gynecol Investig**, v.3, n.1: p.33-8, 1996.

TSENG, L.; GURPIDE, E. Induction of human endometrial estradiol dehydrogenase by progestins. **Endocrinology**, v.97, n.4: p.825-33, Oct 1975.

VICKERS, C. *et al.* Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. **J Biol Chem**, v.277: p.14838-14843, 2002.

VINCENT, S.; MARTY, L.; FORT, P. S26 ribosomal protein RNA: an invariant control for gene regulation experiments in eucaryotic cells and tissues. **Nucleic Acids Res**, v.25; n.21(6): p.1498, March 1993.

VISON, *et al.* Tissue renin-angiotensin systems and reproduction. **Hum Reprod** 12:651-62

WELCHES, W.R. *et al.* Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. **J Hypertens**, v.9, n.7: p.631-638, Jul 1991.

WHITEBREAD, S. *et al.* Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. **Biochem Biophys Res Commun**, v.163: p.284-291, 1989.

YAMAMOTO, K. *et al.* In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v.19(6 Pt 2): p.692-6, 1992.

YOUNG, D. *et al.* Characterization of the rat Mas oncogene and its high-level expression in the hippocampus and cerebral cortex of rat brain. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.85, n.14: p.5339-5342, Jul 1988.

YOUNG, D. *et al.* Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. **Cell**, v.45: p.711-719, 1986.

YUAN, J.S. *et al.* Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics**, v.22;7: p.85, Feb 2006.

ZHU, Z. *et al.* Angiotensin-(1-7) Inhibits Angiotensin II-Induced Signal Transduction. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.40, n.5: p.693-700, November 2002.

ZHU, B.T.; CONNEY, A.H. Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. **Carcinogenesis**, v.19: p.1-27, 1998.

ZUCKERBRAUN, B.S. *et al.* Nitric oxide-induced inhibition of smooth muscle cell proliferation involves S-nitrosation and inactivation of RhoA. **Am J Physiol Cell Physiol**, Epub 2006 Aug 16, v.292, n.2: p.C824-31, Feb 2007.

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

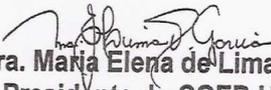
Parecer nº. ETIC 076/07

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 25 de abril de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Expressão da angiotensina (1-7) Mas e de moléculas correlatas no endométrio humano**" 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. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP-UFMG

Recebido no GOB em 06, 06, 07
Assinatura: 