Paulo Cesar Serafini

Expressão protéica no endométrio durante a fase lútea do ciclo menstrual

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

São Paulo

2007

Dedicatória

Aos meus filhos Gustavo e Marcelo,
os meus ídolos e motivo de minha
dedicação exclusiva para a vida e a
ciência.

À Betty por dividir as lidas da
paternidade e compreensão pela
ausência do médico cientista.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Edmund Chada Baracat, pela oportunidade de realizar este estudo, amizade, dedicação, estímulo, incansável mentoração e ensinamento de liderança científica.

Ao Professor Dr. Eduardo Leme Alves da Motta pela amizade, pelos ensinamentos de vida de como um aluno se torna um exímio professor, pela competência e liderança profissional e ajuda com seu tempo na realização desse trabalho.

Ao Professor Dr. Fernando Augusto Soares, por a disponibilizar tecnologia, médicos e funcionário para a realização desse estudo.

À Professora Dra. Angela de Maggio da Fonseca, pelo apoio, pela sugestões, pelo carinho e disponibilidade de seu tempo na contribuição para esse trabalho.

A Dra. Cynthia Aparecida Bueno de Toledo Osório, pela atenção, cuidado, seriedade, ensinamentos na leitura das lâminas de TMA.

Ao Professor Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva, pelo incentivo, auxílio, disponibilidade e intelectualidade para execução desse trabalho.

Ao Professor Gary D. Smith, PhD, pelo incentivo e ensino da ciência básica através de amizade e honestidade, e pelo seu caráter humano e científico impecável.

A Dra. Cláudia Becker, pelo ensino, auxílio e disponibilidade na execução dessa tese.

Ao Dr. Péricles Assad Hassun Filho, pelo incentivo e direcionamento.

Ao Dr. André Monteiro da Rocha, amigo incansável, dividindo e debatendo os assuntos científicos todos os dias.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1. FATOR INIBIDOR DE LEUCEMIA (LEUKEMIA INHIBITOR FACTOR – LIF)	21
2.2. FATOR DE CRESCIMENTO INSULINÓIDE TIPO 1 (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1, IGF-1)	23
2.3. RECEPTOR DE PROGESTERONA (PR)	25
2.4. CLAUDINA-4	27
2.5. RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL 3 (VEGFR-3)	29
2.6. PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA 4 (BMP-4)	31
2.7. CITOQUERATINAS 7 E 17 (CK-7 E CK-17)	33
2.8. PROTEÍNA SOLÚVEL S100	34
2.9. CALRETININA	36
3. PROPOSIÇÃO	38
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	39
4.1 CASUÍSTICA	39
4.1.1. PACIENTES	39
4.1.2. CONSENTIMENTO	40
4.1.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	40
4.1.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	41
4.2 MÉTODOS	42
4.2.1. COLETA DE ENDOMÉTRIO POR MEIO DE BIÓPSIA	42
4.2.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	43

4.2.3. CONFECÇÃO DOS ARRANJOS EM MATRIZ DE AMOSTRAS TECIDUAIS (TISSUE MICROARRAY – TMA)	44
4.2.4. REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS	47
4.2.5. AVALIAÇÃO DAS REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS	50
4.2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5. RESULTADOS	55
5.1. RESULTADOS DA REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA LIF NO TMA	56
5.2. RESULTADOS DA REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA IGF-1 NO TMA	57
5.3. RESULTADOS DA REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA PR NO TMA	58
5.4. RESULTADOS DA REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA CLAUDINA-4 NO TMA	59
5.5. RESULTADOS DA REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA VEGFR-3 NO TMA	60
5.6. RESULTADOS DA REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA BMP-4 NO TMA	60
5.7. RESULTADOS DA REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA CK-7 NO TMA	61
5.8. RESULTADOS DAS REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS PARA CK-17, S100 E CALRETININA NO TMA	63
5.9. ANÁLISE DA EXPRESSÃO CONCOMITANTE DAS PROTEÍNAS LIF, IGF-1, PR, CLAUDINA-4, VEGFR-3, BMP-4 E CK-7 NO ENDOMÉTRIO	63
5.9.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO CONCOMITANTE DAS PROTEÍNAS LIF, IGF-1, PR, CLAUDINA-4, VEGFR-3, BMP-4 E CK-7 NO ENDOMÉTRIO NA FASE LÚTEA	64

5.9.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO CONCOMITANTE DAS PROTEÍNAS LIF, IGF-1, PR, CLAUDINA-4, VEGFR-3, BMP-4 E CK-7 NO ENDOMÉTRIO NA FASE LÚTEA INICIAL	64
5.9.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO CONCOMITANTE DAS PROTEÍNAS LIF, IGF-1, PR, CLAUDINA-4, VEGFR-3, BMP-4 E CK-7 NO ENDOMÉTRIO NA FASE LÚTEA INTERMEDIÁRIA	65
5.9.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO CONCOMITANTE DAS PROTEÍNAS LIF, IGF-1, PR, CLAUDINA-4, VEGFR-3, BMP-4 E CK-7 NO ENDOMÉTRIO NA FASE LÚTEA FINAL	65
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÕES	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
9. ANEXOS	90
9.1. ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PÓS-INFORMADO	90
9.2. ANEXO 2 – FLUXOGRAMA DO ESTUDO.	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Anticorpos monoclonais utilizados nas reações de imunistoquímica, bem como seus clones, diluições e procedência.	49
Quadro 2 - Anticorpos policlonais utilizados nas reações de imunistoquímica, bem como seus clones, diluições e procedência.	49
Quadro 3 - Tecidos utilizados como controles positivos para as reações de imunistoquímica para os anticorpos utilizados no estudo.	50
Quadro 4 - Padrão de marcação de imunistoquímica em TMA.	51
Quadro 5 - Padrão de marcação de imunistoquímica de claudina-4 em membrana glandular endometrial baseada no critério de escore sugerido pela companhia DakoCytomation.	52
Quadro 6 - Imunolocalização celular da expressão dos marcadores moleculares utilizados no estudo.	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fatores embrionários e endometriais envolvidos na aposição (A), aderência (A) e invasão trofoblástica (B) (modificado de Staun-Ram e Shalev, 2005).	14
Figura 2 – Fotomicrografia eletrônica evidenciando os pinopódios em desenvolvimento (a), bem desenvolvidos (b) e em regressão (c) (modificado de Nikas <i>et al.</i> , 1999).	15
Figura 3 – Fotografia ilustrativa de cateter Pipelle utilizado para a coleta de amostras endometriais.	42
Figura 4 – Realização das amostragens de blocos doadores, receptores e montagem do TMA.	45
Figura 5 – Escolha da região para realização da amostragem no bloco doador (A) e identificação na comparação com o bloco de parafina (B).	46
Figura 6 - Fotomicrografia representativa de “cores” endometriais em uma lâmina de imunoistoquímica do TMA (LUPA- 10X).	47
Figura 7 – Histograma da frequência de pacientes distribuídas nas fases lútea inicial (1), lútea intermediária (2) e lútea final (3).	55
Figura 8 – Fotomicrografia de “core” representativo de reação imunoistoquímica para LIF com aumento de 40X..	56
Figura 9 - Histograma das frequências de expressão de LIF durante as fases lúteas inicial (1); intermediária (2) e final (3).	56
Figura 10 – Fotomicrografia de “core” representativo de reação imunoistoquímica para IGF-1 com aumento de 40X.	57
Figura 11 - Histograma das frequências de expressão de -I durante as fases lúteas inicial (1); intermediária (2) e final (3).	57
Figura 12 – Fotomicrografia de “core” representativo de reação imunoistoquímica para PR com aumento de 40X.	59
Figura 13 - Histograma das frequências de expressão de PR durante as fases lúteas inicial (1); intermediária (2) e final (3).	59
Figura 14 – Fotomicrografia de “core” representativo de reação imunoistoquímica para claudina-4 com aumento de 40X.	59

Figura 15 - Histograma das frequências de expressão de claudina-4 durante as fases lúteas inicial (1); intermediária (2) e final (3).	59
Figura 16 – Fotomicrografia de “core” representativo de reação imunoistoquímica para VEGFR-3 com aumento de 40X.	60
Figura 17 - Histograma das frequências de expressão de VEGFR-3 durante as fases lúteas inicial (1); intermediária (2) e final (3).	60
Figura 18 – Fotomicrografia de “core” representativo de reação imunoistoquímica para BMP-4 com aumento de 40X.	61
Figura 19 - Histograma das frequências de expressão de BMP-4 durante as fases lúteas inicial (1); intermediária (2) e final (3).	61
Figura 20 – Fotomicrografia de “core” representativo de reação imunoistoquímica para CK-7 com aumento de 40X.	62
Figura 21 - Histograma das frequências de expressão de CK-7 durante as fases lúteas inicial (1); intermediária (2) e final (3).	62
Figura 22 – Fotomicrografia demonstrando ausência de reação imunoistoquímica de endométrio para CK-17 (A), S100 (B) e calretinina (C) com aumento de 40X.	63

Resumo

Serafini PC. Expressão protéica no endométrio durante a fase lútea do ciclo menstrual. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 93p.

Introdução: O objetivo foi avaliar a expressão de algumas proteínas no endométrio durante a fase lútea do ciclo menstrual de mulheres férteis e inférteis, por meio imunistoquímica de micro-arranjos teciduais (TMA). **Métodos:** Analisou-se a expressão de dez proteínas em 52 amostras de endométrio obtidas nas fases lútea inicial, intermediária (janela de implantação) e final. **Resultados:** As proteínas, fator inibidor de leucemia (LIF), fator de crescimento insulinóide tipo 1 (IGF-1), receptor de progesterona (PR), claudina-4, receptor de fator de crescimento vascular endotelial 3 (VEGFR-3) e citoqueratina 7 (CK-7) mostraram-se expressas no endométrio nas fases lútea inicial, intermediária e final. A proteína morfogenética óssea 4 (BMP-4) expressou-se no endométrio nas fases lútea inicial e intermediária. As proteínas citoqueratina 17 (CK-17), substância solúvel 100 (S100) e calretinina não se expressaram no endométrio durante os três períodos avaliados. Houve correlação entre as expressões protéicas de LIF, IGF-1 e PR. As proteínas LIF e BMP-4 foram diferencialmente expressos no endométrio nas fases lútea inicial, intermediária e final. As proteínas claudina-4 e PR não se expressam simultaneamente no endométrio durante a fase lútea. **Conclusão:** Baseados nos resultados deste estudo podemos sugerir que a presença das proteínas LIF, IGF-1 e PR durante a janela implantacional teria relevância como preditor do adequado desenvolvimento do endométrio.

Descritores: PROTEÍNAS (1), ENDOMÉTRIO (2), CICLO MENSTRUAL (3), FASE LUTEAL (4), IMUNOISTOQUÍMICA (5), PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS DE SINALIZAÇÃO INTERCELULAR (6), RECEPTORES DOS FATORES DE CRESCIMENTO (7)

SUMMARY

Serafini PC. Endometrial protein expression during the luteal phase of the menstrual cycle. [Thesis]. Medical School, University of São Paulo; 2007. 93 p.

Introduction: The objective of this study was to evaluate endometrial protein expressions from fertile and infertile women during the luteal phase of the menstrual cycle by immunohistochemistry in tissue microarrays (TMA). **Method:** The expression of ten proteins obtained from 52 endometrial samples in the initial, mid (window of implantation) and late (premenstrual) phases of the menstrual cycle were evaluated. **Results:** The proteins leukemia inhibitory factor (LIF), insulin like growth factor 1 (IGF-1), progesterone receptor (PR), claudin-4, vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR-3), and cytokeratin 7 (CK-7) were expressed in the endometrium in the three intervals of the luteal phase. Endometrial expression of the morphogenetic bone protein 4 (BMP-4) occurred during the initial and mid luteal phases. Cytokeratin 17, substance 100 and calretinin were not expressed in the luteal phase. There were positive correlations among endometrial expressions of LIF, IGF-1, and PR. LIF and BMP-4 were differently expressed in the initial, mid and late phases of the luteal phase. Claudin-4 and PR did not express simultaneously during the different intervals of the luteal phase. **Conclusion:** These findings suggest that positively correlated endometrial expressions of LIF, IGF-1 and PR at the window of implantation could characterize an adequately developed and receptive endometrium.

Keywords: PROTEINS (1), ENDOMETRIUM (2), MENSTRUAL CYCLE (3), LUTEAL PHASE (4), IMMUNOHISTOCHEMISTRY (5), INTERCELLULAR SIGNALING PEPTIDES AND PROTEINS (6), GROWTH FACTOR RECEPTORS (7).

1. INTRODUÇÃO

A implantação embrionária ocorre após sincrônica e orquestrada série de fenômenos moleculares que se processam entre o blastocisto e o endométrio. Estabelece-se, assim, uma interação seqüencial e recíproca de eventos biológicos que codificam as primeiras e decisivas etapas de uma gravidez saudável (Paria *et al.*, 2001). Este processo é, inicialmente, composto das seguintes fases: a) aposição, na qual o embrião deixa a zona pelúcida e se sobrepõe ao endométrio; b) adesão, durante a qual o embrião adere ao epitélio endometrial; c) invasão do embrião, em sua forma trofoectodérmica blastocitária no útero materno, após a ocorrência da transformação decidual da porção glandular-estromal (Figura 1) (Diedrich *et al.*, 2007).

O intervalo implantacional ocorre apenas quando o endométrio é receptivo à aposição embrionária, à adesão e à invasão. Este intervalo, conhecido como “janela implantacional” é temporalmente definido e restrito durante o ciclo menstrual. Embora não exista um consenso sobre o momento exato da implantação embrionária na espécie humana, estudos clínicos sugerem que a janela implantacional ocorre entre os dias 20 e 24, ou seja, do sexto ao décimo dia pós-ovulação de um ciclo ovulatório ideal de 28 dias (Bergh e Navot, 1992; Wilcox *et al.*, 1999).

A formação de estruturas celulares especializadas com protruções apicais, chamadas de pinopódios, constitui o primeiro passo na fixação do blastocisto ao epitélio endometrial (Nikas *et al.*, 1999). Evidências obtidas em estudos de microscopia eletrônica demonstram que o desenvolvimento dos pinopódios se inicia no dia 19º do ciclo menstrual. Haveria fusão de microvilos, os quais formam uma projeção fina e lisa na superfície das células endometriais edemaciadas (Figura 2A).

Nos dias 20 e 21, observa-se o desaparecimento dos microvilos, evidenciado-se pinopódios bem desenvolvidos, associados a grande protrusão da membrana epitelial (Figura 2B).

Figura 1 – Fatores embrionários e endometriais envolvidos na aposição (A), aderência (A) e invasão trofoblástica (B) (modificado de Staun-Ram e Shalev, 2005).

No 22º dia do ciclo, o edema diminui e pequenos microvilos reaparecem na superfície da membrana celular, que se apresenta enrugada, com pinopódios em regressão. Ao redor do 23º dia do ciclo menstrual, grande parte dos pinopódios já desapareceu (Figura 2C) (Nikas *et al.*, 1999).

Figura 2 – Fotomicrografia eletrônica evidenciando os pinopódios em desenvolvimento (a), bem desenvolvidos (b) e em regressão (c) (modificado de Nikas *et al.*, 1999).

A longevidade dos pinopódios maduros, considerados os marcadores ultra-estruturais da janela de implantação, é de aproximadamente dois dias (Nikas *et al.*, 1999; Nikas e Makrigiannakis, 2003). Há evidências de que o estradiol (E_2) e a progesterona (P) estejam envolvidos na sua formação e maturação, pela ação em receptores específicos de E_2 (ER) e de P (PR) (Develioglul *et al.*, 1999). Recentemente, demonstrou-se que a regulação do receptor de progesterona é simultânea ao desenvolvimento dos pinopódios (Stavreus-Evers *et al.*, 2001).

Concomitantemente à transformação da superfície endometrial, há a decidualização, processo que se caracteriza por mudanças morfológicas e funcionais nos tecidos endometriais glandulares e que inclui várias etapas, entre elas as fases de remodelação tecidual e vascular. A decidualização ocorre, principalmente, sob a influência dos hormônios esteróides ovarianos (Giudice e Ferenczy, 1996), embora diversos fatores de crescimento (FC) participem, ativamente, deste processo (King,

2000). Nesse particular, os fatores endotelial vascular de crescimento (VEGF) e de transformação de crescimento (TGF) estão implicados na proliferação celular decidual, na apoptose e na angiogênese (Caniggia *et al.*, 1999; King, 2000).

O blastocisto e o endométrio sintetizam grande variedade de FC, que têm relevante função na implantação (Giudice, 2003). Para que esse processo ocorra, é necessário haver um equilíbrio na regulação dos diversos genes endometriais que estão sob o controle dos hormônios esteróides e de fatores reguladores locais parácrinos e autócrinos (Tabibzadeh, 1988; Lessey, 2000; Reese *et al.*, 2001; Okulicz e Ace, 2003). Embora vários dos mecanismos já sejam bem conhecidos, o papel desempenhado por grande número de genes, fatores de crescimento, proteínas e uma gama de moléculas necessita ainda ser elucidado.

O advento da tecnologia de *microarray* de DNA complementar (cDNA) permitiu investigar a transcrição de RNA mensageiro (mRNA) de milhares de genes no endométrio de mulheres férteis ao longo de todo o ciclo menstrual, bem como a descoberta da transcrição diferenciada de milhares de genes no decorrer do ciclo menstrual. Além disso, vários estudos possibilitaram o conhecimento comparativo entre os transcritos desses genes no endométrio de mulheres férteis e inférteis durante a fase lútea e, sobretudo, no período da janela de implantação, indicando que a transcrição de alguns genes poderia estar alterada (Kao *et al.*, 2002; Carson *et al.*, 2002; Riesewijk *et al.*, 2003; Borthwick *et al.*, 2003).

Riesewijk *et al.* (2003) compararam o transcriptoma de aproximadamente 12.000 genes no endométrio humano durante o intervalo implantacional. Desses genes, 153 tiveram aumento da transcrição e 58 diminuição. Os genes em que a transcrição foi estimulada puderam ser funcionalmente agrupados como genes

codificantes de imunomoduladores ou de citocinas, proteínas secretoras, proteínas transportadoras, moléculas de adesão e de proteínas com funções diferentes, como as da família substância solúvel S100 (S100) e da citoqueratina 7 (CK-7). Os 58 genes nos quais a transcrição diminuiu, foram agrupados funcionalmente como reguladores do ciclo celular, fatores de transcrição, proteínas vasoativas e proteínas com outras funções celulares, como a calretinina e a proteína centromérica A (Riesewijk *et al.*, 2003).

Outro estudo que utilizou a técnica de *microarray* de cDNA para investigar o transcriptoma endometrial nas fases lútea inicial e lútea intermediária demonstrou que de, aproximadamente, 12.000 genes estudados, 323 mostraram aumento da produção de seu RNA em, no mínimo, duas vezes, enquanto 370 genes tiveram diminuição (Carson *et al.*, 2002). Os genes que codificavam proteínas de superfície celular, fatores de crescimento e citocinas perfizeram 23% daqueles com transcrição estimulada na fase lútea intermediária e 19% dos que tiveram redução de transcrição nesse período codificavam fatores de transcrição e proteínas de remodelação do DNA, correspondendo a 8% dos genes com aumento de transcrição e 13% daqueles que tiveram diminuição. Transcritos de genes de vias de sinalização intracelular e controle do ciclo celular corresponderam a 12% dos que tiveram aumento de produção durante a janela implantacional e 10% daqueles com diminuição. Genes codificantes de diversas proteínas apresentaram 7% de transcrição aumentada e 11% dos com produção de RNA diminuída. Também houve, no transcriptoma diferencialmente expresso, genes com função desconhecida e que corresponderam a 33% dos genes com transcrição aumentada e 35% daqueles com expressão diminuída (Carson *et al.*, 2002).

Já o estudo de Kao *et al.* (2002) identificou 156 genes com transcrição aumentada durante a janela de implantação e 377 com produção de RNA diminuída dentre os 12.686 genes investigados. Dentre as seqüências de DNA que tiveram aumento em sua transcrição, encontravam-se os genes de proteínas de transporte de colesterol, da biosíntese de glicerofosfolipídeos e de carboidratos, de proteínas secretoras, de proteínas reguladoras do ciclo celular, de proteinases, de metalotioneínas e de imunomoduladores, entre outros. Já entre os genes que foram subtranscritos nessa fase estavam os de proteínas secretoras, proteases, transdutores de sinalização intracelular, proteínas de superfície celular e receptores, fatores de transcrição, proteínas de matriz extracelular, imunomoduladores, moduladores de apoptose e reguladores do ciclo celular (Kao *et al.*, 2002).

Borthwick *et al.* (2003) compararam a produção de RNA de 60.000 genes empregando *microarray* de alta densidade, adotando um valor de p de 0,0001 como critério de restrição para a diferença de transcrição entre as fases proliferativa e secretora. Encontraram 149 genes diferencialmente expressos. Os genes diferencialmente transcritos corresponderam a fatores de transcrição, proteases e kinases, metalotioneínas, moduladores de apoptose, proteínas de matriz extracelular, proteínas transportadoras e imunomoduladores, além de um grupo de proteínas com funções diversas (Borthwick *et al.*, 2003).

Os dados sobre a transcrição de RNA obtidos por meio de *microarray* de cDNA constituem bom indicativo da expressão gênica, porém, a maneira mais eficiente e simples de se estudar essa expressão seria por meio do reconhecimento e sinalização da proteína por anticorpos utilizados em ensaios diagnósticos de captura por anticorpos, citometria de fluxo e imunoistoquímica, entre outros (Uhlen e

Ponten, 2005), uma vez que após a transcrição o mRNA é processado, modificado, recomposto e traduzido em uma gama de materiais provenientes do mesmo material genético (Azad *et al.*, 2006). Portanto, são as proteínas, ao invés dos ácidos nucleicos, que realmente refletem o *status* celular e o conhecimento de sua expressão nos tecidos ajuda a discernir estados normais e de doenças (Azad *et al.*, 2006).

Desse modo, conhecer a expressão de proteínas que marcam os eventos moleculares envolvidos no desenvolvimento e na manutenção de um endométrio receptivo é fundamental para se compreender o processo de implantação. A avaliação das proteínas expressas no compartimento endometrial durante a janela de implantação possibilita novas estratégias diagnósticas e clínicas mais complexas do que a simples datação endometrial. Esta foi considerada “padrão de ouro” para se avaliar o endométrio, possui baixo valor preditivo para fertilidade, uma vez que está sujeita a variações entre ciclos de uma mesma paciente e, além disso, que as análises feitas por distintos observadores variam de 20% a 40% (Strowitzki *et al.*, 2006).

Apesar do conhecimento do transcriptoma endometrial nas diversas fases do ciclo menstrual ter evoluído bastante, os estudos sobre a função de cada um desses genes e a tradução dessa informação ainda são escassos para que sejam clinicamente relevantes ou possibilitem novas abordagens terapêuticas (Strowitzki *et al.*, 2006). Baseados nesses dados da literatura o presente estudo foi idealizado, com o objetivo de investigar o perfil da expressão de proteínas no endométrio de mulheres normais e inférteis durante a fase lútea de um ciclo ovulatório espontâneo.

A investigação da expressão protéica foi realizada por meio da tecnologia de micro-arranjos de tecido (*tissue microarray*, TMA). Essa técnica permite que diversos marcadores protéicos sejam avaliados em uma mesma série (Melo-Coelho e

Hess, 2005). Foi validada em estudos que usaram hibridização genômica comparativa para identificar a expressão gênica por *microarray* de DNA (Velculescu *et al.*, 1995; Pinkel *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2002; Hustinx *et al.*, 2004; Callagy *et al.*, 2005). Portanto, utilizamos o TMA para estudar a expressão dos seguintes fatores e proteínas relacionadas à receptividade endometrial, como: (1) fator inibidor de leucemia (leukemia inhibitor factor, LIF); (2) fator de crescimento insulinóide tipo 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1); (3) receptor de progesterona (PR); (4) claudina-4; (5) receptor do fator endotelial vascular de crescimento 3 (VEGFR-3); (6) proteína morfogenética óssea 4 (BMP-4); (7) citoqueratina 7 (CK-7); (8) citoqueratina 17 (CK-17); (9) substância solúvel (S100) e (10) calretinina. Tais proteínas foram escolhidas, pois seus transcritos ou suas expressões encontram-se diferencialmente representadas ao longo do ciclo menstrual (Kao *et al.*, 2002; Carson *et al.*, 2002; Riesewijk *et al.*, 2003; Borthwick *et al.*, 2003).

2. REVISÃO DE LITERATURA

É de grande relevância analisar os fatores de crescimento o LIF, IGF-1, PR, claudina-4, VEGFR-3, BMP-4, CK-7, CK-17, S100 e a calretinina, durante a fase lútea.

2.1. FATOR INIBIDOR DE LEUCEMIA (LEUKEMIA INHIBITOR FACTOR – LIF)

O fator inibidor de leucemia é uma citocina altamente glicosilada, com peso molecular entre 40 e 50 KDa (Kimber, 2005). Foi, inicialmente, reconhecida como um fator capaz de induzir a diferenciação de macrófagos da linhagem de células leucêmicas mielóides M1 (Tomida *et al.*, 1984; Hilton *et al.*, 1988). Entretanto, sabe-se atualmente que tem atuação pleiotrópica relacionada à proliferação, diferenciação e sobrevivência celular em diversos sistemas, como imunológico, nervoso, cardíaco e o reprodutivo (Ozaki e Leonard, 2002).

As citocinas interagem com a esteroidogênese de uma maneira sistêmica e complexa (Bornstein *et al.*, 2004). Evidências sugerem que a citocina produzida pelo endométrio e pelo blastocisto participariam do mecanismo de interação entre o embrião e o útero, juntamente com várias outras citocinas; fatores de crescimento, fatores de crescimento transformantes (TGF) e as moléculas de aderência que iniciam o processo de nidação e atuam também na fase de invasão embrionária (Dominguez *et al.*, 2003; Herrler *et al.*, 2003; Nardo *et al.*, 2003). Chaouat e colaboradores (Chaouat *et al.*, 2002, 2004) demonstraram que a relação materno-fetal não constitui um simples mecanismo de tolerância a um “ser estranho”, mas uma

série de complexas interações de citocinas que modulam seletivamente o diálogo imunológico.

Assim como as interleucinas 6 e 11, a oncostatina, o fator neurotrófico ciliar, a nova neurotrofina 1/fator estimulador de células B 3/citocina símile à cardiotrofina (NNT-1/BSF-3/CLC) e a cardiotrofina 1 (CT-1), o LIF inicia sua ação ao se ligar a um heterodímero protéico transmembrânico formado pela proteína gp-130 e uma unidade receptora transmembrânica específica, no caso do LIF, o receptor de LIF β (LIFR β) (Ozaki e Leonard, 2002). Tal fato faz com que parte dos efeitos do LIF possam ser mimetizados por alguns desses fatores, pois, compartilham da proteína gp-130 e das mesmas vias de sinalização intracelular, as vias JAK/STAT, SHP-2/Ras/ERK e/ou a IP3K/Akt (Kimber, 2005).

O receptor do LIF (LIF-R) está expresso tanto no endométrio como no óvulo. A transcrição do LIF-R se evidencia durante as fases de mórula e de blastocisto, indicando que o LIF embrionário pode agir de maneira parácrina no desenvolvimento do blastocisto (Lei *et al.*, 2004).

Durante a fase lútea intermediária ocorre aumento da síntese e de secreção de LIF pelos pinopódios (Nikas e Makrigiannakis, 2003; Kabir-Salmani *et al.*, 2005). O LIF, em camundongos, é fundamental para a reprodução, uma vez que fêmeas *knock-out* para esse gene apresentam falha de implantação embrionária (Stewart *et al.*, 1992; Dimitriadis *et al.*, 2005; Roy e Matzuk, 2006), enquanto embriões *knock-out* transferidos para fêmeas com fenótipo selvagem são capazes de realizar todas as etapas da implantação (Stewart *et al.*, 1992).

Em mulheres existem evidências de que essa citocina também possui papel relevante na fertilidade. A expressão do RNA mensageiro (mRNA) do LIF, como

também a presença da citocina e de seu receptor (Cullinan *et al.*, 1996), ocorrem durante a “janela de implantação” (Charnock-Jones *et al.*, 1994; Arici *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995). Além disso, a concentração de LIF em lavados uterinos é máxima durante esta fase (Laird *et al.*, 1997; Ledee-Bataille *et al.*, 2002). A associação de infertilidade com alguns genótipos nos quais há menor produção ou baixa atividade de LIF também reforçam o seu papel na implantação (Hambartsoumian, 1998; Giess *et al.*, 1999). Borini *et al.* (1997) administraram LIF durante a transferência embrionária em mulheres inférteis tratadas com FIV mas não obtiveram resultados conclusivos por não terem avaliado se as pacientes exibiam mutação do gene LIF. Adicione-se que Kralickova e associados (Kralickova *et al.*, 2006) estudaram o impacto das mutações no gene LIF em populações de mulheres inférteis, registraram mutações em 2,7% de nulíparas e em 6,9% das com infertilidade secundária. Desse modo, não puderam estabelecer com precisão a relação causal destas mutações como causa da infertilidade. Assim, a importância do LIF na fertilidade e sua contribuição nos tratamentos de reprodução assistida ainda não está elucidada (Bourgain e Devroey, 2003).

2.2. FATOR DE CRESCIMENTO INSULINÓIDE TIPO 1 (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1, IGF-1)

O fator de crescimento insulinóide tipo 1 faz parte de um sistema composto pelo IGF-1 e IGF-2, por dois receptores transmembrânicos (IGF-1R e IGF-2R), seis proteínas de ligação (IGFBPs 1 a 6) e de proteases que clivam as IGFBPs (Hwa *et al.*, 1999; Nayak e Giudice, 2003).

Os fatores IGF-1 e 2 são estruturalmente semelhantes à insulina; têm peso molecular de aproximadamente 7KDa (Hwa et al., 1999; Nayak e Giudice, 2003) e foram identificados em 1957 por Salmon et al (Salmon *et al.*, 1957). Possuem ação mitogênica, afetando tanto o crescimento tecidual como o metabolismo celular. As ações mitogênicas dos IGF-1 são exercidas por sua ligação ao IGF-1R, que é um receptor com atividade tirosina quinase intrínseca, assim como o receptor de insulina. Já o IGF-2R é estruturalmente distinto; permite a ligação de moléculas contendo manose-6-fosfato e seu papel como mediador para os efeitos típicos dos IGFs não é ainda muito claro (Hwa *et al.*, 1999).

As IGFBPs ligam-se aos IGFs com maior intensidade que os seus receptores (Hwa *et al.*, 1999; Nayak e Giudice, 2003) e são responsáveis pela modulação do efeito desses fatores, transportando-os, alterando suas concentrações histoespecíficas, modificando sua meia vida e a disponibilidade para ligação aos receptores (Hwa *et al.*, 1999; Nayak e Giudice, 2003).

Os IGFs circulantes possuem efeitos endócrinos e, aqueles secretados localmente, produzem efeitos parácrinos e autócrinos importantes. No endométrio, a produção de mRNA de IGF-1 aumenta durante a fase proliferativa e o início da fase secretora (Giudice *et al.*, 1998). Parece ser o fator responsável pelos efeitos proliferativos do estradiol (Strowitzki *et al.*, 2006). Já o mRNA de IGF-2 aumenta durante a metade e o final da fase secretora. Esse fator de crescimento seria o mediador das ações da progesterona (Gao *et al.*, 1999; Han e Carter, 2000).

Além da atividade mitogênica, esses fatores de crescimento são capazes de produzir modificações diretamente no endométrio. Verificou-se que a deposição de IGF sobre o endométrio provoca um aumento localizado da permeabilidade vascular,

da decidualização e aumenta expressão da proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) e da ciclo-oxigenase 2 (Cox-2) no sítio de aposição das esferas impregnadas com IGF no endométrio (Paria *et al.*, 2001; Paria *et al.*, 2002).

Outro efeito dos IGFs pode ser exercido diretamente sobre os embriões. Demonstrou-se que quando embriões humanos foram cultivados *in vitro* com a suplementação de IGF ao meio de cultura houve redução do número de células em apoptose e aumento da porcentagem de embriões que se desenvolveram até a fase de blastocisto (Spanos *et al.*, 2000).

As ações do IGF-1 durante os processos de decidualização e implantação são controlados pela expressão de IGFBP-1, que, por sua vez, é regulada pelas concentrações de progesterona (Han e Carter, 2000). Após a decidualização, observou-se que o IGF-2 passa a ter importante função na diferenciação e na angiogênese placentária (Pringle e Roberts, 2007).

2.3. RECEPTOR DE PROGESTERONA (PR)

Há mais de 100 anos sabe-se que a progesterona é essencial para a implantação embrionária e a manutenção da gestação. É um hormônio esteróide contendo 21 carbonos, sendo o maior representante de um grupo de esteróides ovarianos conhecidos como progestagênios (Mani e O'Malley, 2002).

Os progestagênios exercem suas ações por meio de ligação a um receptor, o receptor de progesterona. Este receptor faz parte de uma família de receptores nucleares (NR), que são fatores de transcrição ativados por hormônios (Mani e O'Malley, 2002; Brosens, 2004). Os receptores dessa família possuem 5 regiões: (1) região aminoterminal variável (A/B); (2) domínio conservado de ligação ao DNA

(DBD) ou região C; (3) região dobradiça D; (4) domínio conservado de ligação ao ligante na região E e (5) região F carboxiterminal. Os domínios de transcrição ativada são os fatores de função de ativação de transcrição 1 e 2 (TAF-1 e TAF-2), que se localizam nas regiões A/B (aminoterminal) e E do receptor (Brosens, 2004). Os hormônios esteróides, por serem lipossolúveis, difundem-se facilmente através da membrana celular e ligam-se aos receptores, os quais sofrem mudanças conformacionais que permitem sua translocação, dimerização e ligação, juntamente com alguns co-fatores, ao DNA, modulando assim genes alvos (Mani e O'Malley, 2002; Blaustein, 2004; Brosens, 2004).

As regiões do DNA nas quais o receptor de esteróide ativado se liga são chamadas de elementos de resposta hormonal. Os receptores nucleares ligados a essas regiões recrutam a RNA polimerase II, e dirigem-se às regiões promotoras dos genes e iniciam a transcrição (Brosens, 2004).

A ligação dos PRs aos elementos de resposta promove a transcrição de genes específicos em cada tecido. Há duas isoformas desse receptor: o PR-A e o PR-B, as quais têm a mesma afinidade pela progesterona, mas possuem diferentes intensidades transcricionais. O PR-A tem atividade transcricional menor que a do PR-B, e em geral atua como um inibidor competitivo da transcrição desse receptor (Brosens, 2004).

A expressão de receptores de progesterona no endométrio humano, que passa por etapas de proliferação cíclicas, também varia ao longo do ciclo menstrual. Durante a fase pré-ovulatória, há maior expressão de PR-A e PR-B, que possuem o mesmo padrão de expressão ao longo do ciclo (Attia *et al.*, 2000); na metade e no final da fase lútea ocorre queda da expressão da isoforma PR-A (Narkar *et al.*, 2006).

Durante a janela implantacional, diversos genes, como a claudina-4, a interleucina 15, a anexina A4 e a osteopontina, entre outros, são estimulados pela ativação dos receptores de progesterona, ao passo que os genes do receptor de progesterona, da metaloprotease-11 e da glicoproteína 1 de oviduto, entre outros, têm sua expressão inibida pela progesterona (Talbi *et al.*, 2006). A ativação dos receptores de progesterona provoca a diferenciação e a sobrevivência do tecido decidual durante a implantação embrionária, eventos de fundamental importância (Brosens e Gellersen, 2006). Porém, a relação da presença desses receptores com o resultado dos tratamentos de reprodução assistida de baixa e de alta complexidade não foi ainda estudada.

2.4. CLAUDINA-4

Existem três tipos de junções celulares, que formam o complexo juncional apical celular epitelial e endotelial: a) as junções aderentes; b) os desmossomos e c) as junções oclusas. As junções aderentes e os desmossomos são responsáveis pela adesão entre as células, enquanto as junções oclusas ligam as membranas celulares, selando-as e, assim, permitindo e garantindo o controle do fluxo iônico paracelular e a homeostase (Tsukita *et al.*, 2001). Além disso, as junções oclusas mantêm a polaridade celular, pois, produzem agrupamentos de proteínas de membrana. Dessa maneira, recrutam proteínas sinalizadoras para determinadas regiões das células (Mitic e Anderson, 1998) e podem estar envolvidas na proliferação e diferenciação celular (Morin, 2005).

As junções oclusas são compostas de arranjos protéicos formados pelas ocludinas, proteínas integrais de membrana, chamadas de claudinas-1 e 2 (Furuse *et*

al., 1998). Sabe-se que as proteínas, molécula de adesão e junção (*junction adhesion molecules* – JAM) e a homóloga de pequenos fragmentos-1 (*crumbs homolog-1* *Drosophila* – CRB-1) e as da família com domínio de proteína de densidade pós-sináptica, grande disco supressor de tumor de *Drosophila*, proteína de zona de oclusão-1 (*post synaptic density protein*, PSD95; *Drosophila disc large tumor suppressor*, DlgA; and *zonula occludens-1 protein*, ZO-1-PZD) fazem parte dessas junções (Knust e Bossinger, 2002; Schneeberger *et al.*, 2004).

As claudinas têm aproximadamente 23 KDa e possuem 4 domínios extracelulares; há homologia de 30% entre as claudinas-1 e 2. Hoje são conhecidas mais de 18 claudinas e suas funções não foram ainda completamente estudadas, mas, ao que parece, estariam relacionadas à formação de junções oclusas (Tsukita e Furuse, 1999).

A claudina-4 apresenta aumento de 4 vezes no endométrio humano, do início até a metade da fase lútea do ciclo menstrual (Carson *et al.*, 2002; Kao *et al.*, 2002; Talbi *et al.*, 2006). A claudina-7 também sofre incremento durante a fase secretora (Borthwick *et al.*, 2003). Em ratas, a claudina-1 está presente, de maneira marcante, apenas no endométrio de fêmeas gestantes, desde o primeiro dia da fase lútea (Orchard *et al.*, 2002). Outrossim, é encontrada no epitélio luminal no sítio de aposição e de aderência dos embriões ao endométrio de camundongas e parece ser importante para a formação de barreiras de permeabilidade, além de poder regular a invasão e a ancoragem do embrião, bem como determinar o espaçamento entre eles (Wang *et al.*, 2004).

A expressão de claudinas está ligada à fase de receptividade do endométrio (Carson *et al.*, 2002; Orchard *et al.*, 2002; Kao *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; Talbi

et al., 2006). Essas proteínas, que provavelmente têm sua produção estimulada pela progesterona (Talbi *et al.*, 2006), possuem papel importante na implantação, pois, estão envolvidas com a formação de junções oclusas. Porém, a relação da claudina-4 com a implantação embrionária humana, bem como sua possível expressão no endométrio de mulheres inférteis submetidas a tratamento de reprodução assistida ainda não foi descrita na literatura.

2.5. RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL 3 (VEGFR-3)

A existência de fatores tumorais que estimulam o crescimento de vasos e mantém o aporte de nutrientes para o tecido neoplásico foi postulada em 1939 por Ide e colaboradores (Ferrara, 2004). Apesar disso, a história do fator de crescimento vascular endotelial se iniciou quase 50 anos depois, com o isolamento de um fator produzido por células tumorais de cobaias que produzia aumento de permeabilidade vascular. Devido a esse fato foi denominado de fator tumoral de permeabilidade vascular (VPF). O termo VEGF foi utilizado a partir do estudo de um fator mitogênico solúvel em meio de cultura, produzido por células foliculares hipofisárias. Anos depois houve a clonagem de cDNA de VPF e de VEGF humanos descobrindo-se que estes dois fatores representavam a mesma molécula (Ferrara, 2004).

O VEGF tem sua ação mediada por receptores transmembrânicos, que foram inicialmente descritos *in vitro* e *in vivo* em 1990 e 1992, respectivamente (Plouet e Moukadiri, 1990; Vaisman *et al.*, 1990; Jakeman *et al.*, 1992; Jakeman *et al.*, 1993). Existem três tipos de receptores: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. O VEGFR-1 e o

VEGFR-2 possuem homologia de 44% (Hiklin e Ellis, 2005) e sete motivos similares à imunoglobulina em seu domínio extracelular, um domínio transmembrânico e um domínio tirosina quinase inativo na porção N terminal (Shibuya *et al.*, 1990; Matthews *et al.*, 1991).

O VEGF promove a dimerização de unidades receptoras semelhantes, porém, as unidades de VEGFR-1 têm baixa atividade tirosina quinase intrínseca e, portanto, baixa atividade mitogênica. Postula-se que essa unidade seja um receptor engodo que regula negativamente a atividade do VEGF, pois, promove o seqüestro do fator de crescimento e a diminuição de sua disponibilidade para o receptor VEGFR-2 (Ferrara, 2004).

O VEGFR-2 também se liga ao VEGF, porém, sua afinidade à molécula é menor do que aquela apresentada pelo VEGFR-1. Quando um dímero de VEGFR-2 é formado ocorre a fosforilação dos domínios tirosina quinase, resultando em efeitos mitogênicos e quimiotáticos, aumento da sobrevivência das células endoteliais e angiogênese.

O VEGFR-3, que foi inicialmente clonado a partir de células de leucemia humana e da placenta (Pajusola *et al.*, 1993; Galland *et al.*, 1993), está relacionado à linfoangiogênese e à angiogênese (Zachary, 2001). Camundongos com deleção homozigótica do VEGFR-3 apresentam um acúmulo de líquidos teciduais decorrente da má formação de vasos ao redor do 9º dia de desenvolvimento embrionário (Dumont *et al.*, 1998) e morte entre o 10º e o 12º dias de desenvolvimento com acúmulo de fluído no pericárdio e baixo desenvolvimento dos vasos perineurais (Dumont *et al.*, 1998). Além disso, abortamentos recorrentes podem estar associados a falhas na expressão dos receptores de VEGF, uma vez que mulheres normais e que

levam gestações a termo possuem expressão de VEGFR-3 no estroma, no endotélio vilo-placentário e no estroma decidual, enquanto as que abortam possuem alteração nos padrões de expressão (Vuorela *et al.*, 2000).

A angiogênese é um processo fundamental para a implantação, que depende da remodelação vascular e da conexão dos vasos fetais e maternos. (Lee e De Mayo, 2004). No endométrio humano, o VEGF é produzido especificamente em alguns tipos celulares e acha-se diferencialmente expresso durante as fases do ciclo menstrual (Greb *et al.*, 2002; Licht *et al.*, 2003; Ngan *et al.*, 2006). Na fase proliferativa ocorre a produção do fator de crescimento nas células do estroma e do epitélio endometrial. Após a ovulação, essa expressão fica restrita às células epiteliais (Ngan *et al.*, 2006), atingindo sua produção máxima na metade da fase lútea. O VEGF acha-se presente de maneira intensa na região peri-implantacional do endométrio de mulheres submetidas a ciclos de estimulação ovariana e em pacientes na pós-menopausa em tratamento hormonal (Ngan *et al.*, 2006) e está diretamente associado à decidualização (Licht *et al.*, 2003; Licht *et al.*, 2007). A expressão de VEGF e seus receptores estaria relacionada com a determinação da janela implantacional (Liu *et al.*, 2005); contudo, sua relação com a ocorrência de gravidez em ciclos de reprodução assistida de alta complexidade não é ainda conhecida.

2.6. PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA 4 (BMP-4)

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) foram assim denominadas por Urist e colaboradores em 1965, devido aos componentes ativos encontrados no processo de desmineralização óssea e de extratos ósseos que apresentavam a capacidade de formação de ectopia (Urist *et al.*, 1973).

As BMPs são glicoproteínas responsáveis pelo recrutamento de células progenitoras ósseas, sendo consideradas as responsáveis pela habilidade indutiva e regenerativa dos enxertos ósseos (Sommernan *et al.*, 1983). Em 1988, as primeiras BMPs foram isoladas e seu cDNA foi clonado por Wozney e associados (1988). Neste estudo inicial, os autores descreveram toda a sequência de cDNA das BMP-1, 2, 3 e 4; esta última foi originalmente chamada de BMP-2B. A sequência dos aminoácidos das BMP-2, 3 e 4 são muito similares à dos membros da superfamília dos fatores de transformação do crescimento (TGF- β) (Derynck *et al.*, 1985), que hoje é composta por mais de 35 glicoproteínas (Chang *et al.*, 2002; Shimasaki *et al.*, 2004).

Os membros da superfamília TGF- β podem ter efeito inibitório ou estimulatório sobre as células, dependendo do estágio de diferenciação celular em que venham a atuar (Wozney *et al.*, 1990), enquanto as BMPs representam fatores pleotróficos do crescimento (Hogan, 1996). As BMPs exercem várias funções na proliferação, diferenciação, sobrevivência e na determinação da morte celular programada (apoptose).

Como os padrões de expressão teciduais dos membros da família BMP se tornaram conhecidos e os compostos recombinantes passaram a ficar disponíveis para pesquisa, vários estudos mostraram a expressão de componentes desta família nos tecidos reprodutivos dos mamíferos (McPherron e Lee, 1993; Laitinen *et al.*, 1998). Os efeitos na área da regulação gonadal (Laitinen *et al.*, 1998), bem como a continuidade destas pesquisas permitiram o conhecimento de novos mecanismos da fisiologia reprodutiva e endócrina (Mulsant *et al.*, 2001).

Vários estudos com mRNA mostraram a presença de BMPs na decídua de rata. O mRNA encontra-se distribuído na decídua secundária, com aumento da sua expressão durante a decidualização. Embora ainda não se saiba se os produtos destas proteínas são essenciais para a implantação, o acúmulo desses produtos sugerem que teriam papel na reação decidual e na angiogenese (Hogan, 1996). O BMP-7 acha-se no endométrio do útero da rata durante o ciclo estral, declinando durante a gravidez. Sua transcrição é retroalimentada negativamente pelo estrogênio. Algumas BMPs têm importante função na mediação das interações epitelial-mesenquimais e se expressam nas fases iniciais da implantação embrionária (Paria *et al.*, 2001). Embora a expressão da BMP-4 no endométrio de ratas é baixa, não estando associada à fase de adesão, é possível que ela participe da seqüência de espaçamento entre os embriões desta espécie.

2.7. CITOQUERATINAS 7 E 17 (CK-7 E CK-17)

As citoqueratinas (CKs) estão entre as proteínas mais abundantes da célula, pois, compõem os filamentos intermediários do citoesqueleto (Lanerolle e Cole, 2002). Há 37 subtipos de citoqueratinas, que co-existem em diferentes combinações nos diversos tecidos epiteliais e, em maior proporção, em carcinomas (Schweizer *et al.*, 2006). Formam agrupamentos de heterodímeros para compor os filamentos intermediários, que são flexíveis e determinam o formato da célula (Olson *et al.*, 2002).

As células epiteliais do endométrio expressam as citoqueratinas-8 e 18, comuns a epitélios simples, entretanto, há evidências de que pode ocorrer a expressão de diferentes tipos de CKs na células luminais do endométrio durante a

janela implantacional. Nesse particular, a CK-13 aumenta na região apical dessas células durante a fase secretora do ciclo menstrual, sugerindo que o remodelamento do citoesqueleto seria necessário também para o processo de implantação (Olson *et al.*, 2002). A expressão de CK-8 ocorre na zona decídua primária, podendo estar relacionada à preparação do estroma para a formação de uma barreira semelhante às epiteliais, que são compostas por junções oclusas (Wang *et al.*, 2004).

A citoqueratina-7 é uma proteína abundante nas células trofoblásticas do sinciciotrofoblasto, porém, é pobremente marcada nas células do estroma, o que faz com que ela se constitua em importante marcador de células embrionárias (Goffin *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2005). Já a CK-17 tem sua expressão nas regiões do citotrofoblasto que estão em contato ou que se localizam próximas a depósitos de fibrina (Muhlhauser *et al.*, 1995). A expressão das CK-7 e 17 durante a janela implantacional, bem como sua possível relação com os resultados da gestação em tratamento de reprodução assistida ainda não foram elucidadas.

2.8. PROTEÍNA SOLÚVEL S100

Em 1965, foi isolado um homodímero protéico simétrico que era 100% solúvel em sulfato de amônio saturado; devido a esse fato recebeu o nome de S100 (Moore, 1965). As proteínas S100 têm, aproximadamente, 10 KDa e possuem duas alfa-hélices, que são estabilizadas por ligações não covalentes; em cada uma das hélices há quatro domínios de ligação de cálcio (Garrett *et al.*, 2006). Quando o cálcio se liga a esses domínios acontecem mudanças conformacionais nessas proteínas, fazendo com que sejam capazes de se ligar a proteínas alvo (Heinzmann, 1999; Donato, 2001).

Hoje já são conhecidas mais de 20 proteínas da família S100, que, em sua maioria, são homodímeros e estão presentes de maneira histoespecífica (Garrett *et al.*, 2006). As proteínas S100A8 e S100A9 possuem atividade quimiotática para neutrófilos e macrófagos, porém, a função de muitas outras dessas proteínas ainda não são muito claras, ou estão relacionadas a funções cálcio-dependentes muito diversas.

A S100B é encontrada, predominantemente, em células do sistema nervoso, como células da glia, astrócitos, células de Schwann e neurônios. Desempenha funções de comunicação entre as células e intermedeia processos de crescimento celular, rearranjo do citoesqueleto e transdução de sinais intracelulares dependentes de cálcio (Gazzolo *et al.*, 2006).

A S100A6 acha-se, geralmente, super-expressa em neoplasias, como o melanoma. Em sua conformação ativa liga-se à liprina 1 (Kriaievska *et al.*, 2002), metionina aminopeptidase (Endo *et al.*, 2002), proteína p53 (Grigorian *et al.*, 2001) e a proteínas envolvidas no rearranjo do citoesqueleto e da motilidade celular, como a F-actina, a tropomiosina e a cadeia pesada da miosina II não muscular (Takenaga *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1993; Kriaievska *et al.*, 1994).

Embriões de camundongos com genótipo S100 A8 mutante ($\gamma^{-/-}$ mutante *knock out*) são reabsorvidos pelo endométrio materno por volta do 9º dia de gestação. Percebe-se que entre o 7º e o 8º dia já há infiltração marcante de tecido materno no embrião, antes da reabsorção. Esses dados demonstram ser esta proteína essencial para a proteção embrionária contra a reabsorção (Passey *et al.*, 1999).

Já a proteína S100A10 mostra-se fortemente expressa no sítio de implantação embrionária do endométrio de macacas Rhesus. Essa proteína se combina à anexina

II, formando um heterotetrâmero (AIIIt) (Kassam *et al.*, 1998), o qual, por sua vez, ativa o plasminogênio por meio da conversão de plasmina pelo ativador de plasminogênio tissular (tPA). O AIIIt é encontrado na superfície das células do sinciciotrofoblasto (Kaczan-Bourgois *et al.*, 1996; Kristoffersen *et al.*, 1996) e a tPA foi localizada nos sítios de implantação embrionária de macacas Rhesus nos dias 15 e 16 após a ovulação (Feng *et al.*, 2001). A presença dessa proteína na interface materno-fetal dos sítios de implantação sugere que algumas etapas desse processo sejam cálcio-dependentes (Sun *et al.*, 2004).

Em mulheres, sabe-se que há aumento de 14 vezes na expressão da S100P , que também acha-se elevada em tumores de mama (Guerreiro da Silva *et al.*, 2000), e de 7 vezes na de S100A4 e de S100A1, entre o 2º e o 7º dia após o pico do LH em ciclos naturais (Riesewijk *et al.*, 2003). Entretanto, a expressão protéica de S100, bem como seu comportamento na fase lútea de mulheres inférteis ainda não foi determinada.

2.9. CALRETININA

Rogers isolou, em 1987, um mRNA de aproximadamente 1,4 Kb, que codificava uma proteína da superfamília das proteínas de ligação ao cálcio a partir de homogenatos de retina de galinha (Rogers, 1987). Devido à sua homologia com as proteínas de ligação de cálcio e seu sítio de isolamento, foi chamada de calretinina (Rogers, 1987). Essa proteína possui 29 KDa e sua estrutura exhibe seis motivos EF-hands condensados em dois domínios, sendo muito similar à calbindina, com quem tem maior homologia (58%) dentre as proteínas de ligação ao cálcio (Palczewska *et al.*, 2003; Palczewska *et al.*, 2005).

Tanto a calbindina quanto a calretinina são proteínas citoplasmáticas que atingem sua conformação ativa quando o cálcio se liga aos motivos EF com alta atividade (Schwaller *et al.*, 1997). Inicialmente, acreditava-se que a calretinina estava associada a grupos específicos de neurônios dos sistemas auditivo e visual, e postulava-se que serviam apenas para o tamponamento rápido do cálcio liberado, produzindo um efeito neuroprotetor durante momentos de excitação em que podem ser tóxicos (Lukas e Jones, 1994). Porém, estudos posteriores demonstraram a presença de calretinina associada à membrana celular, provando que existem proteínas alvo para ela (Hubbard e McHugh, 1995; Winsky e Kuznicki, 1995; Hack *et al.*, 2000). A calretinina se ligaria então a componentes do citoesqueleto (Marilley e Schwaller, 2000) e a fatores de transcrição básicos com motivos hélice-volta-hélice (Zimmermann e Schwaller, 2002).

Primeiramente, acreditava-se que a calretinina estava expressa apenas em neurônios, mas sua presença foi revelada, em ratos, nas ilhotas pancreáticas, nas supra-renais, nos testículos e nos ovários (Afework *et al.*, 1995; Novier *et al.*, 1995; Pohl *et al.*, 1992; Redecker e Cetin, 1994), além de se ser abundante em células mesoteliais e mesoteliomas (Doglioni *et al.*, 1996). Em mulheres, está presente nos ovários, sobretudo no epitélio superficial e nas glândulas de inclusão (Cao *et al.*, 2001). A calretinina também se encontra no endométrio humano, mostrando um padrão difuso em sua camada epitelial. A intensidade de marcação da calretinina nas reações imuno-histoquímicas no endométrio aumenta desde o início até o final da fase secretora (Mograbhi *et al.*, 2007). A relação dessa expressão durante a fase lútea tanto de mulheres normais como de inférteis ainda não foi elucidada.

3. PROPOSIÇÃO

Avaliar a expressão das proteínas LIF, IGF-1, PR, claudina-4, VEGFR-3, BMP-4, CK-7, CK-17, S100 e calretinina, por meio de imunoistoquímica e com tecnologia de *tissue microarray* (TMA), no endométrio de mulheres férteis e inférteis, durante três períodos distintos da fase lútea (fases lútea inicial, intermediária e final).

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. CASUÍSTICA

4.1.1. PACIENTES

Estudou-se o endométrio quanto à presença ou ausência de marcação imunoistoquímica de 10 proteínas em três períodos da fase lútea: a) inicial (dias 16-19); intermediária (“janela de implantação”, dias 20-24) e c) final (pré-menstrual, dias 25-28) de 52 mulheres com ciclos menstruais eumenorréicos, atendidas na Clínica Huntington Medicina Reprodutiva em São Paulo, no período de Setembro de 2006 a Julho de 2007.

A subdivisão dos intervalos da fase lútea (inicial, intermediária e final) foi adequada de acordo com o resultado da datação endometrial realizada por dois experientes patologistas, considerando o intervalo de 28 dias como o de um ciclo menstrual ideal. As biópsias endometriais foram obtidas de mulheres com antecedente menstrual normal (intervalo de 26 a 32 dias) e realizadas em ciclo espontâneo.

Todas as mulheres eram eutiroidianas, euprolactinêmicas e apresentavam adequada reserva ovariana comprovada por ultra-sonografia transvaginal e determinações séricas de FSH, estradiol e progesterona no segundo ou terceiro dia do ciclo menstrual. Estas avaliações da reserva ovariana precederam a biópsia endometrial, no mesmo ciclo ovulatório. Documentação da ovulação foi realizada com acompanhamento ecográfico seriado do crescimento e de rotura folicular, bem como do desenvolvimento endometrial, em adição à mensuração da progesterona sérica no 16º dia deste mesmo ciclo. Para a uniformização dos dados, o dia da

ovulação foi considerado, para fins do estudo, como o dia 14 de um ciclo menstrual ideal de 28 dias.

As pacientes foram divididas em dois grupos: A) mulheres com pelve normal, cujo cônjuge eram portadores de infertilidade masculina severa (grupo controle) (n=18) e B) mulheres portadoras de patologia pélvica (n=34).

4.1.2. CONSENTIMENTO

Todas pacientes receberam informação pormenorizada sobre o estudo e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido pós-informado (Anexo 1). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia e pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

4.1.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- a) mulheres com idade entre 21 e 42 anos;
- b) comprovada necessidade de tratamento de reprodução assistida de alta complexidade (fertilização *in vitro* [FIV] e injeção intracitoplasmática de espermatozóide [ICSI]);
- c) paciente não ter recebido qualquer tratamento hormonal prévio ou medicações com efeito no endométrio em um intervalo de pelo menos 90 dias;
- d) apresentarem dois ovários funcionantes;
- e) cavidade endometrial normal baseada em informações provenientes de dados de recente histerossalpingografia e/ou histeroscopia (≤ 6 meses) da data da biópsia do endométrio;

- f) menos de três tentativas de FIV/ICSI com chances de engravidar com esta modalidade de tratamento;
- g) níveis séricos basais (segundo ou terceiro dia do ciclo menstrual) de FSH ≤ 15 IU/L e de estradiol (E2) ≤ 60 pg/ml, mostrando haver adequada reserva ovariana; h) índice de massa corpórea $< 28 \text{ kg/m}^2$.

4.1.4. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- a) portadoras de doenças infecto-contagiosas com possibilidade de transmissão vertical; b) malformações uterinas;
- c) endométrio fino (≤ 7 cm) em ciclo de estimulação ovariana prévia;
- d) cirurgia prévia para retirada de miomas submucosos;
- e) amostras endometriais com ausência ou com pequena quantidade de tecido glandular f) endométrio apresentando reações histológicas de infecções, hiperplasias ou afecções malignas (McCluggage, 2006).

4.2. MÉTODOS

4.2.1 COLETA DE ENDOMÉTRIO POR MEIO DE BIÓPSIA

As pacientes foram submetidas a biópsia endometrial na fase lútea, após exame ultra-sonográfico e os níveis séricos de progesterona serem compatíveis com ovulação ($\geq 3,0$ ng/ml). Foi realizada em sala de exame com o uso de cateter Pipelle (Pipelle de Cornier Endometrial Suction Curette, CooperSurgical, EUA) (Figura 3).

Figura 3. – Cateter de Pipelle

Na grande maioria das pacientes (n=48 – 92,3%) foi efetuada sem o uso de analgésicos ou de qualquer agente anestésico local. Anestesia cervical foi utilizada em 4 (7,7%) mulheres que apresentavam estenose cervical. Nestas, a aplicação da pinça de Pozzi possibilitou efetuar-se uma tração caudal da cérvix, estabilizando-a e, assim, possibilitando uma rápida inserção do cateter Pipelle e a biópsia.

A técnica utilizada para a biópsia endometrial com o cateter Pipelle, após a inserção de espéculo de Graves, que permitiu adequada exposição cervical, seguiu-se as seguintes etapas: a) assepsia com Povidine seguido de limpeza com gaze esterilizada até completa ausência da presença do antisséptico; b) consideração imaginária do eixo cérvico-uterino; c) moldagem do cateter de acordo com o eixo cérvico-uterino; d) após uma inspiração profunda da paciente, o colo uterino era rapidamente exposto; e) o fundo uterino era gentilmente reconhecido; f) o êmbolo do cateter Pipelle era puxado até sua marca final, para obtenção de vácuo; h) aspiração contínua era realizada procedendo-se com movimentos finos e milimétricos do cateter, trazendo-o da parede uterina anterior até região istmo-cervical; i) o cateter era gentilmente empurrado até o fundo uterino, abertura do Pipelle agora orientada

para a parede posterior do útero e repetia-se a manobra como descrita no item h; j) o cateter de Pipelle retornava ao fundo do útero e procedia-se rapidamente a um movimento fino de 360°, assim obtendo uma amostra abrangente da cavidade endometrial e trazendo a ponta do cateter até seu êxito final no óstio cervical externo; k) as amostras endometriais aspiradas tinham um volume de aproximadamente 3 mm³ e foram imediatamente fixadas em formalina. Cuidados foram tomados para que sangue, muco ou ambos não fossem colocados no material a ser fixado.

As amostras endometriais obtidas tinham volume de aproximadamente 3 mm³ e foram imediatamente fixadas em formalina. Cuidados foram tomados para que sangue, muco ou ambos não fossem colocados no material a ser fixado.

Foram incluídos somente os casos nos quais a datação correspondia à fase lútea, obedecendo-se os critérios de Noyes (Noyes et al., 1950), independentemente se estes se encontravam em fase ou fora da fase histológica. Todas as lâminas foram revisadas por dois examinadores sem conhecimento do dia do ciclo menstrual e do estudo. Somente os resultados consensuais foram considerados para análise e para preparação do TMA (tissue *microarray*).

4.2.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras das biópsias de endométrio coletadas foram acondicionadas em tubos plásticos, devidamente identificados, e mantidas em solução de formol tamponado a 4%. Em seguida, foram dispostas em cassetes plásticos do tipo processador/inclisor. Estes foram processados em aparelho autotécnico, com ciclo total de 12 horas para desidratação, diafanização e parafinização. Todas as lâminas

destinadas ao estudo histológico foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE).

Os blocos de parafina obtidos, nesta fase, foram denominados de blocos doadores, a serem utilizados para o preparo do TMA.

4.2.3. CONFECÇÃO DOS ARRANJOS EM MATRIZ DE AMOSTRAS TECIDUAIS (Tissue *Microarray*, TMA)

Conforme detalhado no fluxograma (Anexo 2), do total de 64 amostras de endométrio pré-selecionadas, 6 não eram condizentes com a fase do ciclo menstrual e não foram incluídas no estudo. Desta forma, 58 blocos de parafina com confirmação histológica da datação do ciclo menstrual foram enviados ao laboratório de Anatomia Patológica do Hospital A.C.Camargo, sob responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, para a confecção do TMA.

Assim as 58 amostras de endométrio previamente classificadas foram incluídas na construção de um “bloco-receptor” de parafina de TMA (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, EUA) a partir de amostras retiradas do “bloco-doador” original (Figura 4) (Kononen *et al.*, 1998; Kallioniemi *et al.*, 2001; Uhlen e Ponten, 2005).

Figura 4 – Realização das amostragens de blocos doadores, receptores e montagem do TMA.

Com o auxílio de uma agulha de 1mm de diâmetro (TMArrayer™ punch MP10-1,0mm, Pathology Devices, Inc., EUA), foram feitas perfurações circulares, em duplicata (dois cores de cada caso), no bloco de parafina-doador e no bloco de parafina-receptor. Este, continha assim, duas áreas diferentes de cada caso, após prévia escolha e marcação de área representativa dos tecidos glandular e estromal, depois de terem sido corados por HE (Figura 5).

Figura 5 – Escolha da região para realização da amostragem no bloco doador (A) e identificação na comparação com o bloco de parafina (B).

Foram efetuados cortes histológicos de 3 a 4 μ m de espessura do bloco de parafina-receptor, até todo o seu desgaste; obteve-se um total de 100 lâminas numeradas sequencialmente a partir de 01.

Após a leitura dos números dos prontuários e a checagem dos números de registro do exame anatomopatológico, observou-se que duas pacientes tiveram duas amostras incluídas entre os 58 casos na construção do TMA. Assim, uma amostra de cada paciente foi eliminada da análise (Fluxograma, Anexo 2). Quatro outras pacientes tiveram as amostras descartadas devido à insuficiente quantidade da representação do binômio tissular, glândula-estroma, expressos nos “cores” como é detalhado no Fluxograma (Anexo 2).

Na Figura 6 observa-se a distribuição microscópica de “*cores*” representativos das amostras de endométrio utilizados neste estudo, em uma lâmina corada por imunohistoquímica do TMA.

Figura 6 - Fotomicrografia representativa de “*cores*” endometriais em uma lâmina de imunohistoquímica do TMA (LUPA- 10X).

4.2.4. REAÇÕES DE IMUNOISTOQUÍMICA

As reações imunohistoquímicas para LIF, IGF-1, PR, claudina-4, VEGFR-3, BMP-4, CK-7, CK-17, S100 e calretinina foram processadas em duplicata nos cortes obtidos do bloco de TMA, totalizando 20 lâminas e 108 “*cores*” por marcador. A técnica contemplou a utilização do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC, DAKO[®], Dinamarca), com um único protocolo de recuperação antigênica. As lâminas foram incubadas em solução de ácido cítrico 10mM, pH 6,0, em forno de microondas, na potência máxima de 1300 watts, duas vezes, por 9 minutos cada. Após esfriamento por 20 minutos, à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas em água destilada. A seguir, foi promovido o bloqueio da peroxidase

endógena e imersão em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Todas as lâminas foram incubadas com anticorpo primário diluído em PBS em proporção pré-estabelecida. Para a revelação, as lâminas foram incubadas em solução de substrato cromógeno, Diaminobenzina (DAB. Sigma[®], EUA), sensível à luz, e contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Merck[®], EUA). Para a realização das reações imunoistoquímicas foram utilizados, neste estudo, anticorpos monoclonais e policlonais.

Anticorpos monoclonais VEGFR-3, CK-17 e BMP-4 da NovocastraTM (Leica - mycosystems, Alemanha) contra o VEGFR-3 (NCL-L-VEGFR-3) na diluição 1:100; CK-17 (NCL-CK-17) na diluição de 1:100 e BMP-4 (NCL-BMP-4) na diluição de 1:200. Calretinina, CK-7 e o PR foram estudados a partir de anticorpos da DAKO, contra a calretinina (clone DAK calret 1) na diluição de 1:100 e contra a CK-7 (clone OV-TL 12/30) na diluição de 1:50 e contra os receptores de progesterona o clone PR 636 na diluição de 1:500. Os anticorpos citados anteriormente foram produzidos em camundongos com a utilização de proteínas de origem humana (Quadro 1).

Anticorpos	Clones	Diluição	Procedência
VEGFR-3	KTL-4	1:100	Novocastra
CK-17	E3	1:20	Novocastra
BMP-4	3H2	1:600	Novocastra
Calretinina	DAK calret 1	1:200	DAKO
CK-7	OV-TL 12/30	1:100	DAKO
PR	PR 636	1:1600	DAKO

Quadro 1: Anticorpos monoclonais utilizados nas reações de imunoistoquímica, bem como seus clones, diluições e procedência.

Para se detectar a expressão de claudina-4 e LIF utilizaram-se anticorpos policlonais da Santa Cruz Biothecnology, INC (Santa Cruz, California, EUA) contra a claudina-4 (C-1817664) e o LIF humano, produzidos em cabra, nas diluições de 1:200 e 1:100, respectivamente. A expressão de IGF-1 foi estudada a partir de anticorpo da mesma empresa, produzido em coelho, clone H70, na diluição 1:50 (Quadro 2).

Anticorpos	Diluição	Procedência
Claudina-4	1:200	Santa Cruz
LIF	1:100	Santa Cruz
S100	1:10	DAKO
IGF-1	1:50	Santa Cruz

Quadro 2 - Anticorpos policlonais utilizados nas reações de imunoistoquímica, bem como seus clones, diluições e procedência.

Foram selecionados cortes histológicos de tecidos previamente reconhecidos como controle positivo para o anticorpo testado (Quadro 3). O controle negativo foi realizado com a não utilização do anticorpo primário.

Anticorpos	Tecidos utilizados como controle
LIF	Próstata humana
IGF-1	Pâncreas humano
PR	Carcinoma ductal de mama
Claudina-4	Próstata
VEGFR-3	Placenta
BMP-4	Fígado
CK-7	Carcinoma de endométrio
CK-17	Glândula salivar humana
S100	Schwanoma humano
Calretinina	Testículo humano

Quadro 3 - Tecidos utilizados como controles positivos para as reações de imunoistoquímica para os anticorpos utilizados no estudo.

4.2.5. AVALIAÇÃO DAS REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS NO TMA

A análise das amostras foi feita em microscopia óptica comum. Foram considerados como suficientes, um mínimo de 10% do diâmetro total de 1 (um) “core”/caso contendo normal aparência de glândulas e de estroma na amostra endometrial. A expressão imunoistoquímica foi avaliada de forma específica, para grupos diferentes de anticorpos. A imunopositividade foi analisada pela expressão do depósito cromógeno marrom de DAB nas células. Apenas para o PR, a marcação nuclear foi considerada positiva quando presente em 10% ou mais das células do endométrio contido no “core”; para os outros marcadores (LIF, IGF-1, VEGFR-3,

BMP-4, CK-7, CK-17 e calretinina) foi considerada marcação positiva em citoplasma, seguindo o mesmo padrão de marcação positiva em 10% ou mais das células contidas no “core”.

A análise das amostras, observando a localização da marcação nuclear (PR) e citoplasmática para os outros marcadores, à exceção da claudina-4, foi baseada em escores que permitiram a graduação da intensidade e do gráfico de frequência de marcação positiva ou negativa para a expressão dos diferentes marcadores estudados (método modificado a partir do estudo de Soini (2000) (Quadro 4).

A multiplicação desses dois critérios (intensidade e frequência) fornece um escore combinado para a avaliar a expressão dos diferentes marcadores: 1) **Negativo**: 0 a 1,9; 2) **Positivo fraco**: 2,0 a 4,9; 3) **Positivo médio**: 5,0 a 8,9; e 4) **Positivo Forte**: 9,0 a 12,0.

Localização	Membrana	Citoplasma	Núcleo		
Intensidade	0-Negativo	1-Fraco	2-Moderado	3-Forte	
Frequência %	0) < 1	1) 1 – 10	2) 11- 50	3) 51- 90	4) >90

Quadro 4: Padrão de marcação de imunoistoquímica em TMA.

A avaliação da imunexpressão de claudina-4 em membrana foi baseada no guia de escore sugerido pela DAKO (Guidelines for Scoring Herceptest™) (Quadro 5).

Score	Expressão Protéica	Padrão imunexpressão
0	Negativo	Ausência ou fraca coloração membrana < 10% das glândulas
1+	Negativo	Fraca ou incompleta coloração das membranas; >10% glândulas
2+	Positivo	Completa coloração de fraca a moderada intensidade >10% das membranas
3+	Positivo	Forte e completa coloração glandular > 10% das membranas

Quadro 5: Padrão de marcação de imunoistoquímica de claudina-4 em membrana glandular endometrial baseada no critério de escore sugerido pela companhia DakoCytomation.

O Quadro 6 mostra a localização das expressões imunoistoquímicas observadas com os anticorpos LIF, IGF-1, PR, claudina-4, VEGFR-3, BMP-4, CK-7, CK-17, calretinina e S100.

Localização	Núcleo	Citoplasma	Membrana
LIF		X	
IGF-1		X	
PR	X		
Claudina-4		X	X
VEGFR-3		X	
BMP-4		X	
CK-7		X	
CK-17		X	
Calretinina			X
S100		X	

Quadro 6: Imunolocalização celular da expressão dos marcadores moleculares utilizados no estudo.

4.2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados provenientes das leituras das lâminas de TMA marcadas por imunistoquímica para LIF, IGF-1, PR, claudina-4, VEGFR, BMP-4, CK-7, CK-17, S-100 e calretinina foram tabulados juntamente com as informações sobre a fase do ciclo na qual a paciente se encontrava no momento da realização da biópsia endometrial. Foi utilizado somente os resultados com marcação imunistoquímica forte. Frequências de expressão dessas proteínas foram calculadas para cada fase do ciclo e as diferenças nas proporções de expressão de cada uma das proteínas entre as diferentes etapas da fase lútea foram verificadas por meio do teste de duas proporções.

A relação entre as frequências de expressão das proteínas foi avaliada por meio do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson. A associação entre a expressão das proteínas no endométrio das mulheres férteis e inférteis foi verificada por meio o teste de Qui-quadrado e/ou teste exato de Fischer quando necessário. Esses mesmos testes foram utilizados para verificar a associação da expressão das proteínas LIF, IGF-1, PR, claudina-4, VEGFR, BMP-4 e CK-7 entre si.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Minitab Statistical Software 14 (Minitab Inc, EUA). Os resultados das análises estatísticas com valor de p inferior a 0,05 ($p \leq 5\%$) foram considerados significantes, enquanto aqueles com valor de p entre 0,05 e 0,1 foram considerados como tendência.

5. RESULTADOS

O TMA foi composto com amostras de biópsias endometriais de 52 pacientes com idade de 35 ± 5 anos (média $\pm$ desvio padrão – DP). A histomorfologia revelou que 22 (42%) pacientes se encontravam na fase lútea inicial; 19 (37%) na fase lútea intermediária e 11 (21%) na fase lútea final (Figura 7).

Figura 7 – Histograma da frequência de pacientes distribuídas segundo as fases lútea inicial (1), lútea intermediária (2) e lútea final (3).

As amostras foram submetidas a análise imunoistoquímica com anticorpos contra LIF, IGF-1, PR, , claudina- 4, BMP-4, VEGFR-3, CK-7, CK-17, S-100 e calretinina. Uma vez que não houve diferenças e associações entre a expressão das proteínas estudadas entre as mulheres férteis e inférteis, os dados de expressão protéica foram agrupados para a realização das análises subseqüentes.

5.1. RESULTADOS DA REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA LIF

Fotomicrografia representativa de uma amostra da reação imunoistoquímica para LIF é visualizada na Figura 8. A frequência de expressão de LIF (Figura 9) nas células endometriais aumentou da fase lútea inicial (0,14) até a fase intermediária (0,53; $p<0,005$). Após a fase lútea intermediária houve declínio não significativo na frequência de expressão de LIF (0,27; $p>0,1$).

Figura 8 – Fotomicrografia de “core” representativo de reação imunoistoquímica para LIF com aumento de 40X. Forte marcação de LIF no epitélio endometrial é apontado pela seta.

Figura 9 - Histograma das frequências de expressão de LIF durante as fases lúteas inicial (1); intermediária (2) e final (3). A marcação gráfica * mostra que as frequências de reação imunoistoquímica para LIF nas fases lúteas intermediária (2) e final (3) são significativamente maiores que na fase lútea inicial (1). Não se observaram diferenças significantes nas frequências de expressão entre as fases lúteas intermediária e final.

5.2. RESULTADOS DA REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA IGF-1

Na Figura 10 observa-se uma fotomicrografia representativa de amostra da reação imunoistoquímica para IGF-1. A frequência de expressão do fator de crescimento insulinóide tipo 1 nas células endometriais (Figura 11) aumentou, embora de maneira não significativa, da fase lútea inicial (0,32) para a fase intermediária (0,47) e, diminuindo na fase tardia (0,36; $p>0,05$).

A expressão do IGF-1 mostrou um perfil similar ao do LIF, e apresentou um coeficiente de correlação positiva de 0,99 ($p<0,05$).

Figura 10 – Fotomicrografia de “core” representativo de reação imunoistoquímica para IGF-1 com aumento de 40X. do epitélio intraluminal.

Figura 11 - Histograma das frequências de expressão de IGF-1 durante as fases lúteas inicial (1); intermediária (2) e final (3). Não se observaram diferenças significantes nas frequências de reação imunoistoquímica para IGF-1 nas diferentes fases.

5.3. RESULTADOS DA REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA PR

Fotomicrografia representativa de amostra da reação imunoistoquímica para receptor de progesterona é visualizada da Figura 12. A frequência de expressão do receptor de progesterona também aumentou do início da fase lútea (0,36) até sua fase intermediária (0,56), com declínio no final da fase lútea (0,45). Essas variações não foram significantes (Figura 13).

A frequência de expressão de LIF também apresentou correlação positiva (0,99) com a do receptor de progesterona ($p < 0,05$).

A expressão do receptor de progesterona tendeu ($p < 0,1$) a ser positivamente correlacionada ($r = 0,98$) com a frequência de expressão de IGF-1.

Figura 12 – Fotomicrografia de “core” representativo de reação imunoistoquímica para PR com aumento de 40X.. A seta mostra a coloração intranuclear epitelial.

Figura 13 - Histograma das frequências de expressão de PR durante as fases lúteas inicial (1); intermediária (2) e final (3). Não se observaram diferenças significantes nas frequências de reação imunoistoquímica para o receptor de progesterona nas diferentes fases.

5.4. RESULTADOS DA REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA CLAUDINA-4

Na Figura 14 observa-se fotomicrografia representativa de amostra da reação imunoistoquímica para claudina-4. A frequência de expressão de claudina-4 (Figura 15) diminuiu do início da fase lútea (0,55) até sua metade (0,37) e término (0,36) desta fase (Figura 15). Essas variações não foram significantes.

Figura 14 – Fotomicrografia de “core” representativo de reação imunoistoquímica para claudina-4 com aumento de 40X.. A coloração citoplasmática intraluminal é indicada pela seta.

Figura 15 - Histograma das frequências de expressão de claudina-4 durante as fases lúteas inicial (1); intermediária (2) e final (3). Não se observaram diferenças significantes nas frequências de reação imunoistoquímica para claudina-4 nas diferentes fases.

5.5. RESULTADOS DA REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA VEGFR-3

Na Figura 16 observa-se fotomicrografia representativa de amostra da reação imunoistoquímica para VEGFR-3. A frequência de expressão de VEGFR-3 teve discreta diminuição do início da fase lútea (0,68) até a sua metade (0,63); esse declínio se manteve até o final da fase lútea (0,36) (Figura 17). Essas diferenças não foram

significantes.

Figura 16 – Fotomicrografia de “core” representativo de reação imunoistoquímica para VEGFR-3 com aumento de 40X.. A seta aponta a coloração citoplasmática intraluminal glandular.

Figura 17 - Histograma das frequências de expressão de VEGFR-3 durante as fases lúteas inicial (1); intermediária (2) e final (3). Não se observaram diferenças significantes nas frequências de reação imunoistoquímica para VEGFR-3 nas diferentes fases.

5.6. RESULTADOS DA REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA BMP-4

Fotomicrografia representativa de amostra da reação imunoistoquímica para BMP-4 é visualizada da Figura 18. A frequência de expressão da proteína óssea morfogenética-4 não se alterou da fase lútea inicial (0,3) para a intermediária (0,3), porém, diminuiu brusca e significativamente ($p < 0,03$) na fase lútea final (Figura 19). Não houve expressão dessa proteína na fase lútea final.

Figura 18 – Fotomicrografia de “core” representativo de reação imunoistoquímica para BMP-4 com aumento de 40X.. Nota-se forte coloração do epitélio glandular endometrial (seta).

Figura 19 - Histograma das frequências de expressão de BMP-4 durante as fases lúteas inicial (1); intermediária (2) e final (3). A frequência de expressão da proteína óssea morfogenética-4 não se alterou da fase lútea inicial (0,3) para a intermediária (0,3), porém, diminuiu brusca e significativamente ($p < 0,03$) na fase lútea final. Não houve expressão dessa proteína na fase lútea final.

5.7. RESULTADOS DA REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA CK-7

Fotomicrografia representativa de amostra da reação imunoistoquímica para CK-7 é visualizada da Figura 20. A expressão de CK-7 também variou ao longo da fase lútea. A frequência de expressão desta proteína aumentou do início da fase (0,36) até a sua metade (0,58), após a qual houve diminuição da expressão (0,18) (Figura 21). Entretanto, essas diferenças entre as fases não foram estatisticamente significantes.

Figura 20 – Fotomicrografia de “core” representativo de reação imunoistoquímica para CK-7 com aumento de 40X. Nota-se forte coloração do epitélio glandular endometrial (seta).

Figura 21 - Histograma das frequências de expressão de CK-7 durante as fases lúteas inicial (1); intermediária (2) e final (3). Não houve diferenças significantes na frequência de expressão desta proteína durante os três períodos da fase lútea.

5.8. RESULTADOS DAS REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS PARA CK-17, S100 E CALRETININA

As expressões de CK-17, S100 e calretinina não foram detectadas por meio das reações imunoistoquímicas no TMA (Figura 22).

Figura 22 – Fotomicrografia demonstrando ausência de reação imunoistoquímica de endométrio para CK-17 (A), S100 (B) e calretinina (C) com aumento de 40X.

5.9. ANÁLISE DA EXPRESSÃO CONCOMITANTE DAS PROTEÍNAS LIF, IGF-1, PR, CLAUDINA-4, VEGFR-3, BMP-4 E CK-7

Foram realizadas duas abordagens para analisar a expressão concomitante das proteínas LIF, IGF-1, PR, claudina-4, VEGFR-3, BMP-4 e CK-7 no endométrio. Inicialmente, avaliou-se a existência de co-expressão, de ausência de expressão concomitante ou a expressão de uma proteína na ausência da outra durante a fase lútea do ciclo menstrual. Posteriormente, foram realizadas as mesmas análises, de acordo com os distintos intervalos da fase lútea na qual as pacientes se encontravam (fase lútea inicial, intermediária ou final).

5.9.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO CONCOMITANTE DAS PROTEÍNAS LIF, IGF-1, PR, CLAUDINA-4, VEGFR-3, BMP-4 E CK-7 NA FASE LÚTEA

Observou-se haver relação somente entre a expressão de BMP-4 com a de VEGFR-3 ($p=0,004$). Nesse caso, a ausência de expressão de BMP-4 se acompanhou da falta de expressão de VEGFR-3.

A proteína CK-7 associou-se com co-expressão de claudina-4 ($p=0,007$), IGF-1 ($p=0,022$) e LIF ($p=0,005$). Além disso, esta citoqueratina não se expressou conjuntamente com o receptor de progesterona ($p=0,007$). A expressão de CK-7 não mostrou relação significativa com a presença de outras proteínas.

A ausência de claudina-4 teve sua expressão relacionada com a presença de PR no endométrio ($p=0,000$).

O IGF-1, além da relação com a expressão de CK-7, não se expressou no endométrio quando o VEGFR-3 também estava ausente. Não houve outras relações entre as expressões das proteínas endometriais estudadas.

5.9.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO CONCOMITANTE DAS PROTEÍNAS LIF, IGF-1, PR, CLAUDINA-4, VEGFR-3, BMP-4 E CK-7 NA FASE LÚTEA INICIAL

Durante o início da fase secretora observou-se relação significativa entre as expressões protéicas de claudina-4 e a proteína morfogenética óssea-4. A expressão de claudina-4 não acontecia conjuntamente com a expressão de BMP-4 e vice-versa ($p=0,04$). Não foram observadas outras relações importantes entre as expressões protéicas.

5.9.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO CONCOMITANTE DAS PROTEÍNAS LIF, IGF-1, PR, CLAUDINA-4, VEGFR-3, BMP-4 E CK-7 NA FASE LÚTEA INTERMEDIÁRIA

Quando foram analisadas as expressões protéicas apenas durante a etapa intermediária da fase lútea, correspondente à janela da implantação, notou-se apenas uma relação significativa. A expressão de claudina-4 e de PR foi semelhante nesta fase, ou seja, a expressão de claudina-4 estava significativamente ligada à ausência de PR e vice-versa ($p=0,0001$).

Verificamos, também, que a expressão de CK-7 tendeu a ocorrer concomitantemente com a ausência de BMP-4 ($p=0,07$) e do receptor de progesterona ($p=0,06$).

5.9.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO CONCOMITANTE DAS PROTEÍNAS LIF, IGF-1, PR, CLAUDINA-4, VEGFR-3, BMP-4 E CK-7 NA FASE LÚTEA FINAL

Observou-se que a expressão de claudina-4 ocorreu nas mesmas pacientes que expressavam LIF ($p=0,02$). Nestas pacientes, a CK-7 e o LIF tiveram expressão concomitante ($p=0,05$). Outras relações foram encontradas entre a claudina-4 e o PR e entre o IGF-1 e o VEGFR-3. A claudina-4 e o PR tenderam a manter o padrão de expressão descrito anteriormente, ou seja, a presença de PR implica na ausência de claudina-4, e vice-versa ($p=0,06$). Já a o IGF-1 e VEGFR-3 tenderam a ser co-expressos. Além das inter-relações descritas acima, não foram observadas outras relações importantes na expressão das proteínas no endométrio durante a fase lútea final.

6. DISCUSSÃO

As principais avaliações da expressão protéica no endométrio humano durante a fase lútea foram realizadas por meio de microarrays de cDNA, detectando a presença de RNA de uma quantidade de genes que variaram de 12.000 a 60.000 (Kao *et al.*, 2002; Carson *et al.*, 2002; Riesewijk *et al.*, 2003; Borthwick *et al.*, 2003). Com a evolução dos estudos que comprovaram os achados de cDNA, a reação em cadeia pela transcriptase reversa quantitativa (qRT-PCR) foi utilizada para validar a técnica de *microarray* (Kao *et al.*, 2002; Carson *et al.*, 2002; Riesewijk *et al.*, 2003; Borthwick *et al.*, 2003). A presença de várias proteínas correspondentes aos transcritos avaliados no *microarray* tiveram sua presença detectada em homogenatos teciduais submetidos à técnica de *western blotting* ou por imunistoquímica (Carson *et al.*, 2002; Riesewijk *et al.*, 2003; Borthwick *et al.*, 2003). Tal fato evidencia que a detecção da proteína, mais do que a simples presença de seu transcrito, é fundamental para o estudo da expressão das proteínas e da função das células. Desse modo, o *tissue microarray* é extremamente conveniente para o estudo da expressão protéica. Daí utilizarmos esta técnica em amostras de endométrio para o estudo da expressão protéica durante as várias etapas da fase lútea de mulheres férteis e inférteis.

Assim, no presente estudo, avaliou-se a expressão de LIF, IGF-1, PR, claudina-4, VEGFR-3, BMP-4, CK-7, CK-17, S100 e calretinina no endométrio durante a fase lútea, que foi dividida em fase lútea inicial, intermediária e final. Algumas dessas proteínas, como o LIF, PR, IGF-1, claudina-4 e a BMP-4, já tiveram

suas expressões identificadas no endométrio por meio de estudos imunoistoquímicos (Cullinan *et al.*, 1996) e suas frequências ao longo do ciclo menstrual foram determinadas (Giudice, 2003). Porém, Giudice (2003) e Carson e associados (Carson *et al.*, 2002) incluíram pacientes sem afecção pélvica e não necessariamente férteis. Ao contrário do presente estudo, Riesewijk *et al* (Riesewijk *et al.*, 2003) analisaram as expressões gênicas endometriais na “janela de implantação” em mulheres férteis e inférteis. Estes autores, contudo, validaram a expressão gênica pela quantificação por Q-PCR, que representa um marcador indireto da função da célula endometrial.

A frequência de expressão de LIF observada em nosso estudo assemelhou-se muito com a de mRNA dessa citocina referida por Giudice (2003) para a fase lútea, ou seja, observou-se aumento na expressão dessa citocina do início até a fase lútea intermediária, mantendo-se depois inalterada até o final da fase lútea. O pico da expressão de LIF coincidiu com o estabelecimento da “janela implantacional”, período durante o qual a aposição, aderência e invasão do endométrio ocorrem (Diedrich *et al.*, 2007), e no qual há a formação dos pinopódios (Nikas *et al.*, 1999). Estas estruturas que se encontram na superfície das células do epitélio endometrial receberam esse nome devido à sua função pinocítica, mas recentemente foram descritos como sendo verdadeiros sítios de produção de LIF (Kabir-Salami *et al.*, 2005). Os dados observados neste estudo imunoistoquímico estão de acordo com o de outros pesquisadores quanto ao aparecimento dos pinopódios no início da fase secretora, atingindo seu acme na fase implantacional.

A importância da produção de LIF para a reprodução durante a fase lútea, especificamente na janela de implantação, foi demonstrada por estudos em camundongos *knock out* para essa proteína, os quais, devido a esse fato, apresentam

falha de implantação (Stewart *et al.*, 1992; Dimitriadis *et al.*, 2005; Roy e Matzuk, 2006). Em mulheres, alguns genótipos nos quais há menor produção de LIF estão associados à infertilidade (Hambartsoumian, 1998; Giess *et al.*, 1999). A presença dessa citocina pode ser detectada em lavados uterinos (Ledee-Bataille *et al.*, 2002) e, recentemente, a sua quantificação por meio de ELISA tem sido usada no diagnóstico funcional da cavidade uterina (Mikolajczyk *et al.*, 2007). A obtenção desses lavados uterinos é indolor e de fácil e rápida realização; entretanto, diferentes *kits* diagnósticos de ELISA podem oferecer resultados divergentes, daí a necessidade de padronização dos pontos de corte (Mikolajczyk *et al.*, 2007). Acrescente-se que diferentes volumes do lavado e sua recuperação após ciclo infusão-aspiração do meio, bem como a existência de diferentes especificidades dos anticorpos produzidos nos vários laboratórios e a certeza de que a superfície endometrial foi realmente avaliada com os lavados, reduzem a confiabilidade dos dados. Desse modo, a realização de biópsias endometriais continua sendo a metodologia mais usada, adicionando-se o fato de que a avaliação imunoistoquímica permite com confiabilidade e reprodutibilidade a quantificação da expressão protéica tanto nos compartimentos epitelial glandular, estromal ou em ambos. Acrescente-se que esta seqüência de estudo não se altera com os achados histológicos encontrados na datação endometrial já que existe uma variação de resultados quando os mesmos são submetidos a diferentes patologistas em até 40%, resultando em baixo valor prognóstico (Strowitzki *et al.*, 2006). Talvez, as variações quanto às datações levem em conta as modificações desses dois compartimentos, enquanto a avaliação da presença de expressões protéicas são compartimentalizadas e específicas, sinalizando potenciais funcionais. Futuros estudos com a detecção imunoistoquímica

de várias proteínas, como o LIF, permitirão melhor caracterizar a função tanto do epitélio glandular quanto do estroma endometrial. Esses resultados permitirão detectar marcadores endometriais a serem utilizados como preditores de gestação e de falha de implantação embrionária, bem como poderão ser utilizados para fins terapêuticos.

Apesar da frequência de expressão de IGF-1 estar diretamente correlacionada com a de LIF, não houve diferenças significativas na sua expressão entre as várias etapas da fase lútea. Tal resultado difere em parte daqueles apresentados na literatura e indicam que a expressão de IGF-1 estaria ligada à estimulação mitótica do endométrio durante a fase proliferativa e que sua expressão acha-se aumentada desse período até o início da fase secretora (Giudice *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1994; Giudice *et al.*, 1994). Ao longo da fase lútea, a presença de IGF-1 variou de 32% a 47% dos cortes estudados; entretanto, como não foram realizadas biópsias durante a fase folicular, não podemos precisar se a expressão era maior do que aquela da fase lútea. Mais importante do que essa constatação, foi a observação de que a proporção de pacientes que expressaram LIF e IGF-1 variou de modo similar na fase lútea. Apesar disso, não encontramos associação significativa entre a presença de LIF e de IGF-1 na mesma paciente. Todavia, como esses dois fatores de crescimentos são mitogênicos, poderiam atuar em compartimentos diferentes no próprio endométrio. Justificaria essa suposição o fato de que o LIF age principalmente no epitélio glandular, enquanto o IGF-1 teria função relevante na sustentação decidual.

Notamos haver correlação positiva entre as mulheres que expressaram LIF e o receptor de progesterona. Entretanto, ao contrário do observado com o LIF, a presença de receptores de progesterona não variou significativamente nas três etapas

da fase lútea. Como se conhece, existem duas formas de receptor de progesterona, PRA e a PRB (Brosens, 2004). Os dados da literatura mostram que a expressão do PRA no epitélio endometrial diminui discreta e lentamente após a fase da janela da implantação, enquanto a do PRB diminui rapidamente. Já no estroma endometrial há pequeno aumento da expressão de PRB após a formação dos pinopódios, ao passo que a de PRA se mantém inalterada (Stavreus-Evers *et al.*, 2001). A reação imunoistoquímica realizada para detectar o PR no presente estudo não nos permitiu aquilatar eventuais mudanças na expressão dessas diferentes isoformas de PR. Acrescente-se também que não foi nossa intenção observar a histolocalização desses receptores. Nossos resultados revelaram que apesar de não ser significativo, houve diminuição na frequência de expressão de PR no período correspondente à janela de implantação (0,58) para o final da fase lútea (0,45). Esses resultados assemelham-se aos descritos por Stavreus-Evers *et al.* (2001).

A correlação existente entre a expressão de LIF e PR não explica completamente o mecanismo de regulação do LIF pela progesterona (Vogiagis e Salomonsen, 1999), pois, a inter-relação clara entre essas duas proteínas não foi comprovada estatisticamente, ou seja, não houve associação entre a expressão dessas proteínas em uma mesma paciente em nenhuma das etapas da fase lútea. Porém, eventual ação, direta ou indireta, na regulação do LIF pelo PRA ou PRB também não pode ser completamente descartada.

A frequência de expressão do receptor de progesterona no endométrio tende a estar relacionada à presença de IGF-1. Percebe-se que o aumento ou a diminuição da frequência de PR se acompanha de mudança de igual magnitude na de IGF-1 e LIF. Estas três proteínas têm, portanto, sua expressão inter-relacionada.

Não foram observadas correlações entre as proteínas claudina-4, BMP-4, VEGFR-3, CK-7 entre si e com LIF, IGF-1 e PR, mas, estes resultados não excluem a existência de relações biológicas entre a produção e o efeito de algumas dessas proteínas.

A claudina-4 apresenta clara relação com o receptor de progesterona. Essa proteína, que é constituinte de junções oclusas e auxilia na manutenção do fluxo iônico e do *milieu* paracelular, tem aumento de seus transcritos desde a etapa inicial até a “janela de implantação” (Carson *et al.*, 2002; Kao *et al.*, 2002; Talbi *et al.*, 2006). Não observamos alterações na proporção de mulheres que produziram claudina-4 durante as várias etapas da fase lútea, ao contrário do que ocorreu com a expressão de LIF, IGF-1 e PR.

Talbi *et al.* (2006) supõem que a expressão de claudina-4 é regulada positivamente pela ação da progesterona, porém, a expressão desta proteína não foi validada por meio da detecção imunoistoquímica ou por manipulações farmacológicas. A análise dos resultados do TMA demonstrou claramente que a presença de claudina-4 está associada à ausência do receptor de progesterona no endométrio. Essa relação foi observada quando as pacientes foram analisadas em conjunto e também quando foram divididas em grupos determinados consoante a etapa da fase lútea; o resultado se repetiu nas mulheres que se encontravam tanto na fase lútea intermediária quanto na final.

A expressão de VEGFR-3 não sofreu alterações significativas durante a fase lútea; sua ausência estava ligada à não expressão de IGF-1. Como o VEGFR-3 faz parte de um sistema de sinalização de fatores de crescimento, mais especificamente do fator de crescimento vascular endotelial, e o IGF-1 é também um fator de

crescimento, poder-se-ia supor que, de alguma maneira, as vias de sinalização nas quais esses fatores de crescimento estão envolvidos teriam único sistema de regulação, o qual determinaria essa dupla ausência.

A BMP-4 mostrou-se expressa em 36% das mulheres nas etapas inicial e intermediária da fase lútea, mas não foi detectada na etapa final. As pacientes, quando estudadas em grupo, tiveram a presença dessa proteína associada à ausência de VEGFR-3. O acúmulo de BMP-4 está aparentemente ligado à angiogênese (Hogan, 1996) e, o VEGFR-3, a processos linfoangiogênicos (Zachary, 2003), porém, a ausência de co-expressão não encontra subsídios para discussão na literatura. Assim, os resultados obtidos não nos permitem fazer ilações sobre o papel fisiológico da BMP-4 na fase lútea humana.

Não encontramos variações significantes da proteína CK-7 durante a fase lútea, mas houve associação dessa proteína com alguns fatores de proliferação e diferenciação, como o LIF e o IGF-1, mas não com o receptor de progesterona. A CK-7 e a BMP-4 não tiveram sua expressão associada durante a etapa intermediária da fase lútea. Embora essa proteína seja um componente dos filamentos intermediários, sendo expressa abundantemente em células trofoblásticas (Goffin *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2005), sua expressão imunoistoquímica no endométrio humano é descrita na literatura como baixa. Em nosso estudo, ao contrário, essa citoqueratina aparece no endométrio, pela primeira vez, de modo expressivo. Este achado pode ser parcialmente explicado pelo maior número de mulheres estudadas, como também pela tecnologia empregada na produção do anticorpo anti-CK-7 utilizada para a avaliação imunoistoquímica.

Sabe-se que o cálcio atua como um mediador ou efector de diversos processos intracelulares de repercussão sistêmica. Há ainda processos muito mais sutis que são mediados pelo cálcio, como a exocitose dos grânulos corticais na fertilização e a subsequente ativação embrionária. Atua como um mensageiro intracelular e é capaz de mediar esses processos, pois, sua concentração intracelular é muito baixa (ao redor de 10^{-7}M), podendo elevar-se de maneira transitória pela rápida abertura de canais de cálcio. A transdução da mensagem representada pelo aumento da concentração desse íon acontece por meio de sua ligação a proteínas da família das proteínas de ligação ao cálcio, como por exemplo a da família da S100 e da calretinina.

O aumento na transcrição de RNAs mensageiros de proteínas da família S100, previamente reportado na literatura (Otsuka, 2007; Riesewijk *et al.*, 2003), motivou a inclusão da calretinina no presente estudo, por ser uma proteína reguladora das ações do cálcio no endométrio. Este tem função importante no remodelamento das moléculas de adesão da superfície endometrial e da polaridade dessas células no momento da adesão embrionária (Achache e Revel, 2006). As reações imunoistoquímicas por nós realizadas e que utilizaram anticorpos policlonais para detectar a proteína S-100 e anticorpos monoclonais para a análise de calretinina não foram capazes de evidenciar a presença dessas proteínas, apesar de terem sido positivas nos tecidos controle (Schwanoma humano e testículo humano, respectivamente), excluindo a hipótese de falha da reação imunoistoquímica.

Deve-se atentar ao fato de que os anticorpos utilizados para a detecção de S100 eram de origem policlonal, ou seja, deveriam reconhecer múltiplos epítomos protéicos. Mesmo assim, não há garantia de que todas as proteínas da família S100,

que são mais de 20, sejam reconhecidas por esses anticorpos. Acredita-se, então, que o emprego de anticorpos monoclonais específicos contra S100A10, S100A4 e S100A1 poderiam identificar a expressão dessas proteínas, que têm aumento de transcrição no endométrio. Desse modo, o estudo desses fatores de crescimento poderiam auxiliar, no futuro, a esclarecer melhor o seu papel no endométrio durante a fase lútea e na implantação (Sun *et al.*, 2004).

Já o anticorpo utilizado para a detecção de calretinina era extremamente específico para essa proteína devido à sua origem monoclonal. A ausência desta proteína no endométrio corrobora as informações obtidas por *microarray* de cDNA, nos quais não figurava o transcrito dessa proteína (Lukas e Jones, 1994; Hubbard e McHugh, 1995; Whinsky e Kuznicki, 1995; Hack *et al.*, 2000).

A CK-17 também não foi identificada, apesar de se usar um anticorpo monoclonal específico, capaz de identificar essa proteína em seu controle positivo (glândula salivar humana). A sua ausência durante esta fase do ciclo menstrual, reforça a hipótese de que esta proteína acha-se expressa no citoesqueleto das células trofoblásticas localizadas próximas a depósitos de fibrina (Muhlhauser *et al.*, 1995) e não durante a fase lútea ou no endométrio sem decidualização. Portanto, não poderia se constituir em marcador de atividades fisiológicas do endométrio secretor.

Embasados nos resultados deste estudo, podemos pressupor que a expressão das proteínas LIF, IGF-1 e PR durante o período da janela implantacional se constituiria em preditor do adequado desenvolvimento do endométrio na fase lútea do ciclo menstrual. Futuros estudos nessa linha de pesquisa devem ser realizados para elucidar o real papel dessas proteínas na receptividade endometrial.

7. CONCLUSÕES

1. As proteínas LIF, IGF-1, PR, claudina-4, VEGFR-3 e CK-7 mostraram-se expressas no endométrio nas fases lútea inicial, intermediária e final.
2. A proteína BMP-4 expressou-se no endométrio nas fases lútea inicial e intermediária.
3. As proteínas CK-17, S100 e calretinina não se expressaram no endométrio durante os três períodos da fase lútea avaliados.
4. Houve correlação entre as expressão protéicas de LIF, IGF-1 e PR.
5. As proteínas LIF e BMP-4 estão diferencialmente expressas no endométrio nas fases lútea inicial, intermediária e final.
6. As proteínas claudina-4 e do receptor de progesterona não se expressaram simultâneamente no endométrio durante a fase lútea.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 731–746.

Achtstatfer T, Moll R, Moore B, Franke WW. Cytokeratin polypeptide patterns of different epithelia of the human male urogenital tract: immunofluorescence and gel electrophoretic studies. *J Histochem Cytochem* 1985; 33: 415-426.

Afework M, Burnstock G. Calretinin immunoreactivity in adrenal glands of developing, adult and ageing Sprague-Dawley rats. *Int J Dev Neurosci* 1995;13:515–21.

Arici A, Engin O, Attar E, Olive DL. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *J Clin Endocr Metabol* 1995; 80: 1908–1915.

Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocr Metab* 2000; 85: 2897–2902.

Azad NS, Rasool N, Annunziata CM, Minasian L, Whiteley G, Kohn EC. Proteomics in Clinical Trials and Practice. *Mol Cell Proteom* 2006; 5:1819–1829.

Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril* 1992; 58: 537–542.

Blaustein J. Neuronal steroid hormone receptors : they're not just for hormones anymore. *Endocr Endocrinology* 2004; 145: 1075–1081.

Borini A, Bulletti C, Cattoli M, Serrao L, Polli V, Alfieri S, Flamigni C. Use of recombinant leukemia inhibitory factor in embryo implantation. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 828: 157-161.

Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 215: 135-141.

Borthwick JM, Charnock-Jones DS, Tom BD, Hull ML, Teirney R, Phillips SC, Smith SK. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Human Reprod* 2003; 9: 19-33.

Bourgain C, Devroey P. The endometrium in stimulated cycles for IVF. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 515-522.

Brosens JJ. Steroid receptor action. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18: 265–283.

Brosens JJ, Gellersen, B. Death or survival – progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma *J Mol Endocr* 2006; 36: 389–398.

Callagy G, Pharoah P, Chin SF. Identification and validation of prognostic markers in breast cancer with the complementary use of array-CGH and tissue microarrays. *J Pathol* 2005; 205:388–396.

Caniggia I, Grisaru-Gravnosky S, Kuliszewsky M, Post M, Lye SJ. Inhibition of TGF- β 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J Clin Invest*. 1999; 103: 1641–1650.

Cao JQ, Jones JG, Li M. Expression of calretinin in human ovary, testis, and ovarian sex cord-stromal tumors. *Int J Gynecol Pathol* 2001; 20: 346–352.

Carson DS, Largow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vernon M, Yuan L, Fritz MA, Lessey B. Changes in gene expression during early to mid luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high density microarray screening. *Mol Human Reprod* 2002; 8: 871-879.

Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily. *Endocr Rev* 2002; 23: 787–823.

Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, Martal J. A brief review of recent data on some cytokine expression at the materno-fetal interface which might challenge the classical TH1/TH2 dichotomy. *J Reprod Immunol* 2002; 53: 241-256.

Chaouat G, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. Reproductive Immunology: reassessing the TH1/TH2 paradigm? *Immunol Lett* 2004; 92; 207-214.

Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Fenwick P, Smith SK. Leukaemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time. *J Reprod Fert* 1994; 101: 421–426.

Chen DB, Hilsenrath R, Yang ZM, Le SP, Kim SR, Chuong CJ, Poindexter AN, Harper MJ. Leukaemia inhibitory factor in human endometrium during the menstrual cycle: cellular origin and action on production of glandular epithelial cell prostaglandin in vitro. *Human Reprod* 1995; 10: 911–918.

Cullinan EM, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard T, Lessey BA, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc of Natl Acad Sci* 1996; 93: 3115-3120.

Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV. Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 1985; 316: 701–705

Develioglu OH, Hsiu JG, Nikas G, Toner JP, Oehninger S, Jones JrHW. Endometrial estrogen and progesterone receptor and pinopode expression in stimulated cycles of oocyte donors. *Fertil Steril* 1999; 71: 1040–1047.

Diedrich K., Fauser BCJM, Devroey P, Griesinger G. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update* 2007; 13: 365–377.

Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 613–630.

Dogliani C, Tos AP, Laurino L, Dogliani C, Tos AP, Laurino L, Iuzzolino P, Chiarelli C, Celio MR, Viale G. Calretinin: a novel immunocytochemical marker for mesothelioma. *Am J Surg Pathol* 1996; 20:1037–46.

Dominguez F, Pellicer A, Simon C. The chemokine connection: hormonal and embryonic regulation at the human maternal-embryonic interface-a review. *Placenta* 2003; 24 (Suppl B) S48-S55.

Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 637–668.

Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K. Cardiovascular Failure in Mouse Embryos Deficient in VEGF Receptor-3. *Science* 1998; 282: 946-951.

Endo H, Takenaga K, Kanno T, Satoh H, Mori S. Methionine aminopeptidase 2 is a new target for the metastasis-associated protein, S100A4. *J Biol Chem* 2002; 277: 26396–26402.

Feng Q, Liu K, Liu YX, Byrne S, Ockleford CD. Plasminogen activators and inhibitors are transcribed during early macaque implantation. *Placenta* 2001; 22: 186–199.

Ferrara N. VEGF: Basic Science and Clinical Progress. *Endocr Rev* 2004; 25: 581–611.

Furuse M, Fujita K, Hiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998; 141: 1539–1550.

Galland F, Karamysheva A, Pebusque MJ, Borg JP, Rottapel R, Dubreuil P, Rosnet O,

Birnbaum D. The FLT4 gene encodes a transmembrane tyrosine kinase related to the vascular endothelial growth factor receptor. *Oncogene* 1993; 8:1233- 1240.

Gao J, Mazella J, Suwanichku A, Powell DR, Tseng L. Activation of the insulin-like growth factor binding protein-1 promoter by progesterone receptor in decidualized human endometrial stromal cells. *Mol Cel Endocr* 1999; 153: 11–17.

Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR. S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem*. 2006; 281: 677–680.

Gazzolo D, Marinoni E, Di Iorio R, Lituânia M, Marras M, Bruschetti M, Bruschetti P, Frulio R, Michetti F, Petraglia F, Florio P. High maternal blood S100B concentrations in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction and intraventricular hemorrhage. *Clin Chem* 2006; 52: 819–826.

Giess R., Tanasescu I., Steck T, Stedtner M. Leukemia inhibitory factor gene mutations in infertile women. *Mol Human Reprod* 1999; 5: 581-586.

Giudice LC, Ferenczy A. 1996. The endometrial cycle. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z. Reproductive Endocrinology, Surgery, and Technology. Vol 1. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 272-300.

Giudice LC, Mark SP, Irwin JC. Paracrine actions of insulin-like growth factors and IGF binding protein-1 in non-pregnant human endometrium and at the decidual-trophoblast interface. *J Reprod Immunol* 1998; 39: 133–148.

Giudice LC. Elucidating endometrial function in the post-genomic era. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 223–235.

Goffin F, Munaut C, Malassine A, Evain-Brion D, Frankenne F, Fridman V, Dubois M, Uzan S, Mervie P, Foidart JM. Evidence of a limited contribution of feto-maternal interactions to trophoblast differentiation along the invasive pathway. *Tissue Antigens* 2003; 62: 104–116.

Greb S, Armeanu K, Tausch S, von Otte W, Klockenbusch L, Kiesel R.. Menstrual cycle dependent expression patterns of vascular endothelial growth factor (VEGF-A) and angiopoietins (Ang) in eutopic endometrium and upregulation of Ang-1 and Ang-2 in endometriosis. *Fertil Steril* 2002; 77: s18-s19.

Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, Kriajevska M, Carlberg C, Kruse C, Cohn M, Ambartsumian N, Christensen A, Selivanova G, Lukanidin E. *J Biol Chem* 2001; 276: 22699–22708.

Guerreiro da Silva, I. D., Y. F. Hu, I. H. Russo, X. Ao, A. M. Salicioni, X. Yange J. Russo. S100P calcium-binding protein overexpression is associated with

immortalization of human breast epithelial cells in vitro and early stages of breast cancer development in vivo. *Int J Oncol* 2000; 16: 231-40.

Hack NJ, Wride MC, Charters KM, Kater SB, Parks TN. Developmental changes in the subcellular localization of calretinina. *J Neurosci* 2000; RC67: 1-5.

Hambartsoumian, E. Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *Am J Reprod Immunol* 1998; 2: 137-143.

Han H, Bearss DJ, Browne LW, Calaluce R, Nagle RB, Von Hoff DD. Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray. *Cancer Res* 2002; 62: 2890–2896.

Han VKM, Carter AM. Spatial and temporal patterns of expression of messenger RNA or insulin-like growth factors and their binding proteins in the placenta of man and laboratory animals. *Placenta* 2000; 21: 289–305.

Heizmann CW. Calcium-binding proteins in the central nervous system. *Neurochem Res* 1999; 24: 1097–1100.

Herrler A, von Rango U, Beier HM. Embryo-maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation. *Reprod Biomed Online* 2003; 6:244–256.

Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23:1011-1027

Hilton DJ, Nicola NA, Gough NM, Metcalf D. Resolution and purification of three distinct factors produced by Krebs ascites cells which have differentiation-inducing activity on murine myeloid leukaemia cell lines. *J Biol Chem* 1988; 263: 9238–9243.

Hogan BLM. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996; 10: 1580–1594.

Hubbard M., McHugh NJ. Calbindin_{28kDa} and calbindin_{30kDa} (calretinin) are substantially localised in the particulate fraction of rat brain. *FEBS Lett* 1995; 374: 333–337.

Hustinx SR, Cao D, Maitra A, et al. Differentially expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas identified through serial analysis of gene expression. *Cancer Biol Ther* 2004;3:1254–1261.

Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 1999; 20: 761–787.

Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 1992; 89:244–253.

Jakeman LB, Armanini M, Philips HS, Ferrara N. Developmental expression of binding sites and mRNA for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology* 1993; 133: 848–859.

Kabir-Salmani M, Nikzad H, Shiokawa S, Akimoto Y, Iwashita M. Secretory role for human uterodomes (pinopods): secretion of LIF. *Mol Human Reprod* 2005; 11: 553–559.

Kaczan-Bourgeois D, Salles JP, Hullin F, Fauvel J, Moisand A, Duga-Neulat I, Berrebi A, Campistron G, Chap H. Increased content of annexin II (p36) and p11 in human placenta brush-border membrane vesicles during syncytiotrophoblast maturation and differentiation. *Placenta*. 1996; 17:669–676.

Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10: 657–662.

Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, Osteen K, Taylor RN, Lessey BA, Giudice LC. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology*. 2002; 143: 2119–2138.

Kassam G, Choi KS, Ghuman J, Kang HM, Fitzpatrick SL, Zackson T, Zackson S, Toba M, Shinomiya A, Waisman DM. The role of annexin II tetramer in the activation of plasminogen. *J Biol Chem* 1998; 273: 4790–4799.

Kimber SJ. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. *Reproduction* 2005; 130: 131–145.

King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 28–36.

Knust E, Bossinger O. Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* 2002; 298: 1955-1959.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst

J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for highthroughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4: 844–847

Kralickova M, Sima R, Vanecek T, Sima P, Rokyta Z, Ulcova-Gallova Z, Sucha R, Uher P, Hess O. Leukemia inhibitory factor gene mutations in the population of infertile women are not restricted to nulligravid patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006, 127: 231-235.

Kriajevska MV, Cardenas MN, Grigorian MS, Ambartsumian NS, Georgiev GP, Lukanidin EM. Non-muscle myosin heavy chain as a possible target for protein encoded by metastasis-related mts-1 gene. *J Biol Chem* 1994; 269: 19679–19682.

Kriajevska M, Fischer-Larsen M, Moertz E, Vorm O, Tulchinsky E, Grigorian Ambartsumian N, Lukanidin E. Liprin $\beta 1$, a member of the family of LAR transmembrane tyrosine phosphatase-interacting proteins, is a new target for the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1). *J Biol Chem* 2002; 277: 5229–5235.

Kristoffersen EK, Matre R. Surface annexin II on placental membranes of the foetomaternal interface. *J Reprod Immunol* 1996; 36: 141–149.

Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Li TC, Zhang X. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Human Reprod* 1997; 12: 569–574.

Laitinen M, Vuojolainen K, Jaatinen R, Ketola I, Aaltonen J, Lehtonen E, Heikinheimo M, Ritvos O. A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mech Dev* 1998; 78: 135–140.

Lanerolle P, Cole AB. Transduction in the nucleus cytoskeletal proteins and gene regulation: form, function, and signal. *Science STKE* 2002; 139: 1-3.

Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G. Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Human Reprod* 2002; 17: 213–218.

Lee KY, DeMayo FJ. Animal models of implantation. *Reproduction* 2004; 128: 679–695.

Lei T, Yang ZQ, Xia T, Chen ZD, Yuan JH, Zhu Y. Stage-specific expression of leukemia inhibitory factor and its receptor in rabbit pre-implantation embryo and uterine epithelium during early pregnancy. *Reprod Domest Anim* 2004; 39:13-18.

Lessey BA. Endometrial receptivity and the window of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14: 775–788.

Licht P, Russu V, Lehmeyer S, Wissentheit T, Siebzehnrüb E, Wildt L. Cycle dependency of intrauterine vascular endothelial growth factor levels is correlated with decidualization and corpus luteum function. *Fertil Steril* 2003; 80: 1228-1233.

Licht P, Fluhr H, Neuwinger J, Wallwiener D, Wildt L. Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation? *Mol Cell Endocr* 2007; 269: 85–92.

Lin Y, Yaoying Zeng, Jingfang Di and Shan Zeng Murine CD2001CK71 trophoblasts in a poly (I:C)-induced embryo resorption model. *Reproduction* 2005; 130: 529–537.

Liu Y , Gao F, Wei P, Chen X, Gao H, Zou R, Siao L, Xu F, Feng Q, Liu K, Hu Z. Involvement of molecules related to angiogenesis, proteolysis and apoptosis in implantation in rhesus monkey and mouse. *Contraception* 2005; 71: 249– 262.

Lukas W, Jones KA. Cortical neurons containing calretinin are selectively resistant to calcium overload and excitotoxicity in vitro. *Neuroscience* 1994; 61: 307–316.

Mani SK, O'Malley BW. Mechanism of progesterone receptor action in the brain. In: Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, Rubin RT, eds. *Hormones, brain and behavior*. Vol 3. Amsterdam: Academic Press; 2002, 643–682.

Marilley D, Schwaller B. Association between the calcium-binding protein calretinina and cytoskeletal components in the human colon adenocarcinoma cell line WiDr. *Exp Cell Res* 2000; 259: 12–22.

Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Nat Acad Sci* 1991; 88: 9026–9030.

McCluggage WG. My approach to the interpretation of endometrial biopsies and curettings. *J Clin Pathol* 2006; 59: 801-812.

McPherron AC, Lee S-J. 1993 GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor- β superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J Biol Chem* 1993; 268: 3444–3449.

Mello-Coelho V, Hess KL. A conceptual and practical overview of cDNA microarray technology: implications for basic and clinical sciences. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 1543-1552.

Mikolajczyk M, Wirstlein P, Skrzypczak J. The impact of leukemia inhibitory factor in uterine flushing on the reproductive potential of infertile women – a prospective study. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58: 65–74.

Mitic LL, Anderson JM. Molecular architecture of tight junctions. *Ann Rev Physiol* 1998; 60: 121–42.

Moghrabia HA, Elkeilani A, Thomas JM, Mai KT. Calretinin: An immunohistochemical marker for the normal functional endometrial stroma and alterations of the immunoreactivity in dysfunctional uterine bleeding. *Pathol Res Prac* 2007; 203: 79–83.

Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Comm* 1965; 6: 739-744.

Morin PJ. Claudina proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res* 2005; 65: 9603–9606.

Muhlhauser J, Crescimanno C, Kasper M, Zaccheo D, Castelucci M. Differentiation of human trophoblast populations involves alterations in cytokeratin patterns'. *J Histochem Cytochem* 1995; 43: 579-189.

Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schibler L, Monget P, Lanneluc I, Pisselet C, Riquet J, Monniaux D, Callebaut I, Cribiu E, Thimonier J, Teyssier J, Bodin L, Cognie Y, Chitour N, Elsen JM. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 5104–5109.

Nardo LG, Nikas G, Makrigiannakis A. Molecules in blastocyst implantation. Role of matrix metalloproteinases, cytokines and growth factors. *J Reprod Med* 2003; 48: 137-147.

Narkar M, Kholkute S, Chitlange S, Nandedkar T. Expression of steroid hormone receptors, proliferation and apoptotic markers in primate endometrium. *Mol Cell Endocr* 2006; 246: 107–113.

Nayak NR, Giudice LC. Comparative biology of the IGF system in endometrium, decidua, and placenta, and clinical implications for foetal growth and implantation disorders. *Placenta* 2003; 24: 281–296.

Ngan ESW, Lee KY, Yeung, Hextan WSB, Ngan YS, Ng EHY, Ho PC. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor is expressed in human peri-implantation endometrium, but not in endometrial carcinoma. *Endocrinology* 2006; 147: 88–95.

Nikas G, Develioglou OH, Toner JP, Jones Jr HW. Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum Reprod* 1999; 14: 787–792.

Nikas G, Makrigiannakis A. **endometrial pinopodes and uterine receptivity**. *Ann NY Acad Sci* 2003; 997: 120-123.

Novier A, Nicolas D, Krstic R. Colocalization of calretinin and glucagon in rat pancreatic A cells. *Acta Histochem* 1997; 99: 217–22.

Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1950; 1: 3–25.

Okulicz WC, Ace CI. Temporal regulation of gene expression during the expected window of receptivity in the rhesus monkey endometrium. *Biol Reprod* 2003; 69: 1593–1599.

Olson GE, Winfrey VP, Blaeuer GL, Palisano JR, NagDas SK. Stage-specific expression of the intermediate filament protein cytokeratin 13 in luminal epithelial cells of secretory phase human endometrium and peri-implantation stage rabbit endometrium. *Biol Reprod* 2002; 66: 1006–1015.

Orchard MD, Megan D, Murphy CR. Alterations in tight junction molecules of uterine epithelial cells during early pregnancy in the rat. *Acta histochem* 2002; 104: 149–155.

Ozaki K, Leonard WJ. cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem* 2002; 277: 29355–29358.

Pajusola K, Aprelikova O, Armstrong E, Morris S, Alitalo K. Two human FLT4 receptor tyrosine kinase isoforms with distinct carboxyterminal tails are produced by alternative processing of primary transcripts. *Oncogene* 1993; 8: 2931–2937.

Palczewska M, Groves P, Batta G, Heise B, Kuznicki J. Calretinin and calbindin D28k have different domain organizations. *Protein Sci* 2003; 12: 180-184.

Palczewska M, Batta G, Groves P, Linse S, Kuznicki J. Characterization of calretinin I–II as an EF-hand, Ca²⁺, H⁺-sensing domain. *Protein Sci*. 2005; 14: 1879-1887.

Paria BC, Ma W, Tan J, Raja S, Das SK, Dey SK, Hogan BL. Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors. *Proc Nat Acad Sci* 2001; 98: 1047–1052

Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science* 2002; 296: 2185–2188.

Passey RJ, Williams E, Lichanska AM, Wells C, Hu S, Geczy CL, Little MH, Hume DA. A null mutation in the inflammation-associated S100 protein S100A8 causes early resorption of the mouse embryo. *J Immunol* 1999; 163: 2209–2216.

Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; 20: 207–211.

Plouet J, Moukadiri HJ. Characterization of the receptors for vasculotropin on bovine adrenal cortex-derived capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 22071–22075.

Pohl V, van Rampelbergh J, Mellaert S, Parmentier M, Pochet R. Calretinin in rat ovary: an *in situ* hybridization and immunohistochemical study. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1160:87–94.

Pringle KG, Roberts CT. New light on early post-implantation pregnancy in the mouse: roles for insulin-like growth factor-II (IGF-II)? *Placenta* 2007; 28: 286-297.

Redecker P, Cetin Y. Rodent pancreatic islet cells contain the calcium-binding proteins calcineurin and calretinin. *Histochem Cell Biol* 1997; 108:133-9.

Reese J, Das SK, Paria BC, Lim H, Song H, Matsumoto H, Knudtson KL, DuBois RN, Dey SK. Global gene expression analysis to identify molecular markers of uterine receptivity and embryo implantation. *J Biol Chem* 2001; 276: 44137-44145.

Riesewijk A, Martin J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, Mosselman S, Simon C. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* 2003. 9: 253-264.

Rogers JH. Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J Cell Biol* 1987; 105: 1343-1353.

Roy A, Matzuk MM. Deconstructing mammalian reproduction: using knockouts to define fertility pathways. *Reproduction* 2006; 131: 207-219

Salmon W, Daughaday W. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfation incorporation by cartilage *in vitro*. *J Lab Clin Med* 1957; 49: 825-836.

Schneeberger E, Eveline E, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C1213-C1228.

Schwaller B, Durussel I, Jermann D, Herrmann B, Cox JA. Comparison of the Ca²⁺-binding properties of human recombinant calretinin-22k and calretinina. *J Biol Chem* 1997; 272: 29663-29671.

Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, Maltais L, Omary MB, Parry DAD, Rogers MA, Wright MW. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol*. 2006; 174: 169-174.

Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990; 8:519-527

Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system In mammalian reproduction. *Endocr Rev* 2004; 25: 72-101, 2004.

Soini Y. Expression of claudinas 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. *Histopath* 2005; 46: 551-60.

Sommernan M, Hewitt AT, Varner HH, Schiffmann E, Termine J, Reddi AH. Identification of bone matrix-de-rived chemotatic factor. *Calcif Tissue Int* 1983; 35: 481-485.

Spanos S, Becker DL, Winston RML, Hardy K. Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development. *Biol Reprod* 2000; 63: 1413–1420.

Stavreus-Evers A, Nikas G, Sahlin L, Eriksson H, Landgren BM.. Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptors. *Fertil Steril* 2001; 76: 782–791.

Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 1992 ; 359: 76-79.

Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, von Wolff M. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update*. 2006; 12: 617–630.

Sun X, Li F, Li J, Tan Y, Piao Y, Tang S, Wang Y. Determination of genes involved in the early process of embryonic implantation in Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) by suppression subtractive hybridization 1. *Biol Reprod* 2004; 70: 1365–1373.

Tabibzadeh S. Molecular control of the implantation window. *Hum Reprod Update* 1988; 4: 465–471.

Takenaga K, Nakamura Y, Sakiyama S, Hasegawa Y, Sato K, Endo H. Binding of pEL98 protein, an S100-related calcium-binding protein, to nonmuscle tropomyosin. *J Cell Biol* 1994; 124: 757–768.

Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat CN, Kempson R., Lessey BA, Nayak NR, Giudice LC. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006; 147: 1097–1121.

Tomida M, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hozumi M. Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukaemic M1 cells from conditional medium of mouse fibroblast L929 cells. *J Biol Chem* 1984; 259: 10978–10982.

Tsukita S, Furuse M. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol* 1999; 9: 268-273.

Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 285–93.

Uhlen M; Ponten F. Antibody-based proteomics for human tissue profiling. *Mol Cel Proteom* 2005; 4:384–393.

Urist MR, Iwata H, Ceccotti PL, Dorfman RL, Boyd SD, McDowell RM, Chien C. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Natl Acad Sci* 1973; 70: 3511–3515.

Usadi RS, Murray MJ, Bagnell RC, Fritz MA, Kowalik AI, Meyer WR, Lessey BA. Temporal and morphologic characteristics of pinopod expression across the secretory phase of the endometrial cycle in normally cycling women with proven fertility. *Fertil Steril* 2003; 79:970–974.

Vaisman N, Gospodarowicz D, Neufeld G. Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1990; 265: 19461–19466.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science* 1995; 270: 484–487.

Vogiagis D, Salamonsen LA. The role of leukaemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy. *J Endocr* 1999; 160: 181–190.

Vuorela P, Corpén O, Tuppalä M. Halmesmäki E. VEGF, its receptors and TIE receptors in recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 276–282.

Wang X, Matsumoto H, Zhao X, Das SH, Paria BC. Embryonic signals direct the formation of tight junctional permeability barrier in the decidualizing stroma during embryo implantation. *J Cell Scienc* 2004; 117: 53–62.

Watanabe Y, Usada N, Minami H, Morita T, Tsugane S, Ishikawa R, Kohama, Tomida Y, Hidaka H. Calvasculin, as a factor affecting the microfilament assemblies in rat fibroblasts transfected by src gene. *FEBS Lett* 1993; 324: 51–55.

Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1999; 340: 1796–1799.

Winsky L, Kuznicki J. Distribution of calretinin, calbindin D28k, and parvalbumin in subcellular fractions of rat cerebellum: effects of calcium. *J Neurochem* 1995; 65: 381–388.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation molecular clones and activities. *Science* 1988; 242: 1528–1534.

Wozney JM, Rosen V, Byrne M, Celeste AJ, Moutsatsos I, Wang EA. Growth factors influencing bone development. *J Cell Sci* 1990; 13: 149–56.

Zachary I, Glikli G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 568–581.

Zar JH. 1999. Biostatistical analysis. New Jersey: Prentice Hall. 663p.

Zhou J, Duspın BA, Giudice LC. Insulin like growth factor system gene expression in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:1723–34.

Zimmermann L, Schwaller B. Monoclonal antibodies recognizing epitopes of calretinins: Dependence on Ca^{2+} -binding status and differences in antigen accessibility in colon cancer cells. *Cell Calcium* 2002; 31: 13–25.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PÓS-INFORMADO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

- 1. NOME DO PACIENTE :**
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:** **SEXO:** M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO:**/...../.....
- ENDEREÇO** **Nº** **APTO:**
- BAIRRO:** **CIDADE:**
- CEP:** **TELEFONE: DDD (.....)**
- 2. RESPONSÁVEL LEGAL**
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)**
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE :** **SEXO:** M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO:**/...../.....
- ENDEREÇO:** **Nº** **APTO:**
- BAIRRO:** **CIDADE:**
- CEP:** **TELEFONE: DDD (.....)**

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

- 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:** A exposição à organoclorados na cafeicultura e seu impacto na carcinogênese mamária
- 2. PESQUISADOR:** Domingos Auricchio Petti
- CARGO/FUNÇÃO:** Professor Associado **INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº**
- UNIDADE DO HCFMUSP:** Disciplina de Ginecologia HCFMUSP
- 3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:**
- SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO X ☒ RISCO MÉDIO
- RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐
- (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
- 4. DURAÇÃO DA PESQUISA :** 01 à 02 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa – Esta pesquisa tem como objetivo avaliar a ação dos defensivos agrícolas no organismo de mulheres que residem em áreas cafeicultoras e sua relação com a incidência no aumento do câncer de mama.
2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais – Serão identificadas as casas das mulheres com diagnóstico de câncer de mama e após identificação será coletado resíduos para verificar presença de agrotóxicos, para saber se há relação do câncer com a exposição a estes resíduos químicos.
3. desconfortos e riscos esperados – Mínimos, pois serão tomadas as medidas de proteção individual durante a coleta de amostras de água e solo.
4. benefícios que poderão ser obtidos – O maior benefício desta pesquisa é a conscientização quanto aos riscos para a população da exposição aos defensivos agrícolas e sua relação com o aumento do câncer de mama na população de Minas Gerais.
5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo – Uso de agrotóxicos conforme orientação do profissional habilitado.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência médica.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa, estando a disposição o Pronto Socorro de Ginecologia e os pesquisadores, nos telefones 3069-6647 e 3082-7394.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Prof. Dr. Domingos Auricchio Petti 30696647

3

VI. OBSERVAÇÕES**COMPLEMENTARES:** _____**VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, 13 de abril de 2006.

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

3

9.2. ANEXO 2 - FLUXOGRAMA DO ESTUDO