

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS REGULADORAS DO
SISTEMA COMPLEMENTO, DAF E CD59, NO
ENDOMÉTRIO DE MULHERES COM ABORTOS
ESPONTÂNEOS RECORRENTES**

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências da Saúde. Área de concentração:
Biologia da Reprodução.*

ALUNA: MAYRA BERALDO ANDOZIA
ORIENTADOR: Prof. Dr. RUI ALBERTO FERRIANI
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSÉ ELPÍDIO BARBOSA

**RIBEIRÃO PRETO
2009**

Dedicatórias

Dedico este trabalho,

À **Deus** por me conceder serenidade, paciência e força diante de tantos momentos de desespero, ansiedade e saudade durante esta jornada. Posso ser ferida, mas nunca vencida, pois sou serva de um Deus vivo e indestrutível, que me faz vitoriosa e mais do que vencedora.

Ao meu pai **Milton**, o melhor coração que já conheci na minha vida, que mesmo à distância, esteve perto, suprimindo em todos os momentos minhas necessidades, e me encorajando com palavras para ser forte e enfrentar a vida e as nossas escolhas.

À minha mãe **Selma** pela força e pelo estímulo que me impulsionou a buscar vida nova a cada dia, que não é somente uma mãe, mas uma companheira, uma amiga e que me levou no colo em todos os momentos em que caí em desespero ou medo.

À minha irmã **Thaisa** pessoa admirável e de bom coração, que mesmo distante, sempre esteve presente e orando pela minha vida e pela minha felicidade.

Agradecimentos

Às pacientes e voluntárias que aceitaram participar deste trabalho, sem as quais ele não seria possível.

Ao Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, por ter acreditado em mim mais do que eu mesma, pela oportunidade de realizar este estudo e pela orientação, paciência, confiança, dedicação e apoio a mim dispensados em todos os momentos em que precisei.

Ao Prof. Dr. José Elpídio Barbosa do Departamento de Imunologia e Bioquímica, por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório. Um dia você me deu um voto de confiança e, por isso hoje, aqui estou.

Ao Prof. Dr. Roberto S. Costa do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, por disponibilizar seu laboratório e seus funcionários para o meu aprendizado em imunohistoquímica e pela colaboração na leitura dos cortes histológicos.

Aos técnicos Ana Maria Anselmi Dorigan, Ana Beatriz Berto de Alcântara Agnesini, Osmar Luis Silva e Abel Dorigan Neto por serem pessoas com quem sempre pude contar diante de tantas dificuldades enfrentadas.

Ao Dr. Gyl Eanes Barros Silva pela disponibilidade em colaborar com a leitura dos cortes histológicos e com a realização das fotos para dissertação.

Às funcionárias do laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, Maria Albina V. Bortolieiro, Maria Auxiliadora Pádua Rosa, Marisa, Sandra Aparecida Cavichiollo Vianna pelo apoio nas coletas de sangue e nas análises sorológicas, ajuda fundamental para realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Carolina Sales Vieira pelo verdadeiro companheirismo, força, obsessão e humildade em tudo que faz. Pessoa amiga e sempre disposta a ajudar. Que Deus esteja sempre abençoando a sua vida e a sua família. Você é muito importante para mim.

Ao residente Cássio e ao Serviço de Endoscopia Ginecológica, meu agradecimento pelo aprendizado e incentivo contínuo na minha formação, especialmente aos Professores: Antonio Alberto Nogueira, Francisco Cândido Reis, Júlio César Rosa e Silva e Hermes Barbosa por estarem sempre abertos e disponíveis para realização das biópsias endometriais.

Ao Dr. Rodrigo Alves Ferreira, Dr. Luiz Alberto Manetta e Dra. Stael Porto Leite pela colaboração com a realização dos exames ultrassonográficos.

Aos pós-graduandos pelos momentos de desabafo e risadas com quem tive o prazer de conviver durante este período.

À Comissão de Pós-graduação em Tocoginecologia, pela oportunidade de fazer meu mestrado neste setor, o que é motivo de muito orgulho para mim. À querida Suelen Bezerra, pela disponibilidade e paciência em me ajudar a desenrolar todos os processos burocráticos, além de ter se tornado um ombro amigo e conselheiro. Obrigada por tudo.

À FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro imprescindível na confecção desta pesquisa.

*“Crescer significa mudar e mudar envolve riscos,
uma passagem do conhecido para o desconhecido.”*

Autor Desconhecido

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
RESUMO	xi
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 SISTEMA COMPLEMENTO.....	19
1.1.1 Ativação do Sistema Complemento	20
1.1.1.1 Via Clássica.....	20
1.1.1.2 Via Alternativa	22
1.1.1.3 Via das Lectinas	23
1.1.1.4 Complexo de Ataque á Membrana (MAC).....	24
1.1.2 Regulação do Sistema Complemento	25
1.1.2.1 Proteínas Reguladoras Solúveis	26
1.1.2.2 Proteínas Reguladoras Ligadas à Membrana Celular	28
1.1.2.2.1 Fator Acelerador de decaimento (DAF).....	29
1.1.2.2.2 CD59	30
1.2 SISTEMA COMPLEMENTO E O SISTEMA REPRODUTIVO.....	31
1.3 ABORTO ESPONTÂNEO RECORRENTE (AER).....	37
1.3.1 Síndrome de Anticorpos Antifosfolípides (SAAF)	40
2 OBJETIVO	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 CASUÍSTICA.....	46
3.1.1 Pacientes.....	46
3.1.1.1 Grupo Aborto	46
3.1.1.2 Grupo Controle.....	48
3.1.2 Coleta das biópsias de endométrio	49
3.1.3 Processamento das amostras de endométrio	51
3.1.4 Imunohistoquímica (IHC).....	51
3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
4 RESULTADOS.....	55
4.1 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA MAC (C5b-9) NO ENDOMÉTRIO DO GRUPO CONTROLE E DO GRUPO ABORTO.....	55

4.2 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DAF NO ENDOMÉTRIO DO GRUPO ABORTO.....	58
4.3 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA CD59 NO ENDOMÉTRIO DO GRUPO ABORTO.....	62
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÕES	80
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
ANEXO A	95
ANEXO B	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ativação e Regulação do SC	31
Figura 2: Pipelle de Cornier.....	50
Figura 3: Reação de Imunohistoquímica no miocárdio humano normal utilizando o anticorpo anti-TCC (C5b-9). Controle negativo da reação utilizando área isquêmica de infarto de miocárdio (200X).....	56
Figura 4: Reação de Imunohistoquímica no miocárdio humano normal utilizando o anticorpo anti-TCC (C5b-9). A. Controle positivo da reação utilizando área isquêmica de infarto de miocárdio (200X). B. Controle positivo da reação utilizando área isquêmica de infarto de miocárdio (200X).....	56
Figura 5: Reação de Imunohistoquímica das glândulas do tecido endometrial humano normal utilizando o anticorpo anti-TCC (C5b-9). A. Reação Negativa na fase secretória do ciclo menstrual de mulheres com aborto de repetição (200X). B. Reação Negativa na fase secretória do ciclo menstrual de mulheres com aborto de repetição (200X).....	57
Figura 6: Reação de Imunohistoquímica das glândulas do tecido endometrial humano normal utilizando o anticorpo anti-TCC (C5b-9). A. Reação Negativa na fase secretória do ciclo menstrual de mulheres férteis normais (200X). B. Reação Negativa na fase secretória do ciclo menstrual de mulheres férteis normais (400X).....	57
Figura 7: Reação de Imunohistoquímica na placenta humana normal utilizando o anticorpo anti-DAF (CD55). A. Controle negativo da reação utilizando o tecido placentário a termo normal (200X). B. Controle negativo da reação utilizando o tecido placentário a termo normal (400X).	60
Figura 8: Reação de Imunohistoquímica na placenta humana normal utilizando o anticorpo anti-DAF (CD55). A. Controle positivo da reação utilizando o tecido placentário a termo normal (200X). B. Controle positivo da reação utilizando o tecido placentário a termo normal (400X).	60
Figura 9: Reação de Imunohistoquímica das glândulas do tecido endometrial humano normal utilizando o anticorpo anti-DAF (CD55). A. Reação Positiva na fase secretória do ciclo menstrual de mulheres com aborto de repetição (400X). B. Reação Positiva na fase secretória do ciclo menstrual de mulheres férteis normais (400X).....	61

Figura 10: Histograma da frequência de expressão de DAF (CD55) na fase secretória do ciclo menstrual de mulheres férteis normais (Controle) e das com Aborto de Repetição (Aborto)..... 61

Figura 11: Reação de Imunohistoquímica na placenta humana normal utilizando o anticorpo anti-CD59. A. Controle negativo da reação utilizando o tecido placentário a termo normal (200X). B. Controle negativo da reação utilizando o tecido placentário a termo normal (400X). 64

Figura 12: Reação de Imunohistoquímica na placenta humana normal utilizando o anticorpo anti-CD59. A Controle positivo da reação utilizando o tecido placentário a termo normal (200X). B. Controle positivo da reação utilizando o tecido placentário a termo normal (400X). 64

Figura 13: Reação de Imunohistoquímica das glândulas do tecido endometrial humano normal utilizando o anticorpo anti-CD59. A e B. Reação Positiva na fase secretória do ciclo menstrual de mulheres com aborto de repetição (400X). C e D. Reação Positiva na fase secretória do ciclo menstrual de mulheres férteis normais (400X). 65

Figura 14: Histograma da frequência de expressão de CD59 na fase secretória do ciclo menstrual em mulheres férteis normais (Controle) e das com Aborto de Repetição (Aborto) 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pacientes do Grupo Abortos Recorrentes segundo a idade, a paridade e a etiologia do aborto.	48
Tabela 2: Padrão de marcação de imunohistoquímica nas células glandulares endometrial.....	53
Tabela 3: Resultados semi-quantitativos para o anticorpo anti-TCC (C5b-9) no tecido endometrial de mulheres com Aborto de Repetição (Aborto) e das férteis normais (Controle).....	55
Tabela 4: Resultados semi-quantitativos para o anticorpo anti-DAF (CD55) no tecido endometrial de mulheres com Aborto de Repetição (Aborto) e das férteis normais (Controle).....	59
Tabela 5: Resultados semi-quantitativos para o anticorpo anti-CD59 no tecido endometrial de pacientes com Aborto de Repetição (Aborto) e das normais (Controle).	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ISCA: Infertilidade Sem Causa Aparente

AER: Aborto Espontâneo Recorrente

DNA: do inglês *Deoxyribonucleic Acid*

Células NK: do inglês *Natural killer*

SC: Sistema Complemento

IC: Imunocomplexo

VC: Via Clássica

VA: Via Alternativa

MAC: Complexo de Ataque à Membrana

C1-INH: do inglês *C1 esterase inhibitor*

Mg²⁺: íon magnésio

IgA: Imunoglobulina A

IgE: Imunoglobulina E

Ca²⁺: íon cálcio

MBP: do inglês *mannose-binding protein*

MBL: do inglês *mannose-binding lectin*

MASP: do inglês *MBL-associated serine protease*

CRPs: do inglês *Complement Regulatory Proteins*

C4bp: do inglês *C4b-binding protein*

MCP: do inglês *Membrane Cofactor Protein*

CR1: do inglês *Complement Receptor 1*

SCR: do inglês *Short Consensus Repeats*

CR2: do inglês *Complement Receptor 2*

CR3: do inglês *Complement Receptor 3*

CR4: do inglês *Complement Receptor 4*

DAF: do inglês *Decay-accelerating factor*

HRF: do inglês *Homologous Restriction Factor*

KDa: kilodalton

GPI: glicosilfosfatidilinositol

IDO: do inglês *indoleamine 2,3 dioxygenase*

Crry: do inglês, *Complement inhibitor of rat cell membrane resembling mouse*

SAAF: Síndrome de Anticorpos Antifosfolípidos

β2-GPI: β2 Glicoproteína I

Crry-Ig: Imunoglobulina ligada ao, do inglês, *Complement inhibitor of rat cell membrane resembling mouse*

TNF- α : do inglês *Tumor necrosis factor*

FIV: Fertilização in vitro

LES: Lupus Eritematoso Sistêmico

PROMISSE: do inglês

SERPAT: Serviço de Patologia

HC: Hospital das Clínicas

FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

USP: Universidade de São Paulo

GO: Ginecologia e Obstetrícia

FSH: do inglês *Follicle-Stimulating Hormone*

LH: do ingles *Luteinizing Hormone*

PRL: Prolactina

TSH: do ingles *Thyroid-Stimulating Hormone*

FAN: Fator Anti-Núcleo

ACA: Anticorpo Anti-Cardiolipina

Anti- β 2-GPI: anti- β 2 Glicoproteína I

PIL: Pesquisa de Inibidor Lúpico

TCK: Tempo de coagulação de Kaolin

DRVVT: do ingles *Dilute Russell's viper venom time*

FV Leiden: Fator V de Leiden

FII G20210A: Fator II G20210A

VDRL: do inglês *Venereal Disease Research Laboratory*

HBsAG: do ingles *Antigen of the Hepatitis-B-Virus*

HCV: do inglês *Hepatitis-C-Virus*

Anti-HIV: do inglês *anti-Human Immunodeficiency Virus*

RIF: Reação de Imunofluorescência Indireta

PO: Pós-Ovultarório

HE: Hematoxilina-Eosina

IHC: Imunohistoquímica

Tris-EDTA: abreviação do inglês *Tris(hydroxymethyl)aminomethane-Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

PBS: do inglês *Phosphate buffered saline*

IgG: Imunoglobulina G

ABC: avidina-biotina-peroxidase

DAB: Diaminobenzidina

RESUMO

Andozia, M.B. **Expressão das Moléculas Reguladoras do Sistema Complemento, DAF e CD59, no endométrio de mulheres com abortos espontâneos recorrentes.** Proforma (Mestrado), 91f. – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2009.

Durante o ciclo menstrual, o endométrio se torna receptivo à chegada do “futuro embrião”. Estes eventos são regulados pela liberação de progesterona durante a fase secretória do ciclo, que aumenta a secreção do componente C3 do Sistema Complemento (SC). Neste período, também foi observado o aumento fisiológico da expressão de algumas proteínas reguladoras do SC (CRPs) como: C1Inh, C4bp, DAF, CD59 e clusterina, o que sugere uma forte regulação da atividade deste sistema, favorável à implantação e ao desenvolvimento embrionário. Modificações na expressão destas proteínas poderiam resultar em aborto espontâneo recorrente (AER). Neste trabalho estudou-se a expressão endometrial de DAF e CD59 no endométrio de pacientes com AER, durante a fase secretória do ciclo. Adicionalmente, verificou-se a ativação do SC através da presença do neoantígeno de C9 neste mesmo material. A casuística foi composta de nove mulheres férteis normais (Grupo Controle) e doze mulheres com AER (Grupo Aborto), todas analisadas durante a fase secretória do ciclo. A técnica utilizada para detecção destas proteínas foi a imunohistoquímica. O neoantígeno de C9 não foi detectado em nenhum dos grupos, tanto nas glândulas quanto no estroma endometrial. DAF e CD59 foram detectados tanto no Grupo Controle quanto no Grupo Aborto. Houve expressão nitidamente mais acentuada de ambas as CRPs, DAF e CD59, durante a fase secretória intermediária do Grupo Aborto, embora sem diferença estatística. Houve expressão para DAF e CD59 no estroma endometrial de ambos os grupos. Assim, os resultados deste trabalho apontam para a ausência do neoantígeno de C9 no endométrio humano normal e no endométrio humano de patologias como o AER. As CRPs, DAF e CD59, se mostraram presentes tanto no endométrio humano normal quanto no endométrio humano patológico por AER, com destaque para o aumento da expressão de DAF e CD59 na sub-fase intermediária secretória do ciclo menstrual, período crítico para a implantação, sugerindo que alguma alteração neste período possa resultar na posterior perda gestacional.

Palavras chaves: endométrio, aborto, ciclo menstrual, Sistema Complemento, DAF, CD59 e neoantígeno de C9.

ABSTRACT

Andozia, M.B. **Expression of Complement Regulatory Proteins, DAF e CD59, in endometrium of women with recurrent spontaneous abortion.** Proforma (Mestrado), 91f. – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2009.

In the cycle menstrual, the endometrium becomes ready to the arrived of embryo future. These events are controlled by mechanisms like, liberation of progesterone during the secretory phase of cycle, that increases the secretion of C3 component of Complement System (CS). In this period, it was also observed the physiologic increase of the expression of some CS regulatory proteins (CRPs) like: C1Inh, C4bp, DAF, CD59 and clusterin, a fact suggesting strong regulation of the activity this system. Changes in this regulation can be harmful to implantation and to embryony development, causing recurrent spontaneous abortion (RSA). To goal of the present study is to evaluate the endometrial expression of the Membrane Complex Attack (MAC) of CS, representing by neoantigen C9, in the normal and patologic human endometrium with RSA during the secretory phase of the menstrual cycle and of the CRPs, DAF e CD59, in the patologic human endometrium with RSA during the secretory phase, contributing to better understanding of the CS regulation in the endometrium in no physiologic conditions. The study group consisted of twelve endometrial biopsy, during the secretory phase of the menstrual cycle, of women with RSA of no apparent cause, compared to a control group of nine endometrial biopsy, in the same phase, of normal fertile women evaluated to endometrial expression of the neoantigen C9, DAF e CD59 by the immunochemistry technique. Neoantigen C9 was not detected in any group, in the secretory phase of the menstrual cycle in the endometrial glandular epithelium and stromal cells. DAF e CD59 were expressed in both groups during the secretory phase. DAF e CD59 were detected more intensely during the intermediate secretory phase of the Abortion Group when compared to the Control Group. Meanwhile, it not detected any significance difference. There was expression of DAF e CD59 in the stromal cells to the both groups. In summary, we data show that neoantigeno de C9 isn't expressed in the normal and patologic human endometrium, and the CRPs, DAF e CD59, are expressed in the normal and patologic human endometrium, predominating in the intermediary secretory phase of the cycle compared to the controls suggesting

that some changes in the implantation period can result in the future gestational loss.

Key words: endometrium, Complement System, abortion, infertility and cycle menstrual.

1 INTRODUÇÃO

O endométrio é um tecido complexo que sofre mudanças morfológicas e estruturais durante o ciclo menstrual. Desta forma, somente durante um curto período deste ciclo o endométrio está receptivo para a chegada do blastocisto. Este período é chamado janela de implantação e, nos humanos, ocorre usualmente entre o décimo nono e o vigésimo quarto dia do ciclo ovulatório normal. Este futuro embrião expressa antígenos paternos, que são geneticamente estranhos à mãe e, portanto, pode incitar as mesmas reações de intolerância imunológica observada nos tecidos enxertados. Contudo, fisiologicamente, isto não acontece, indicando uma possível relação de tolerância imunológica entre a mãe e o feto. Esta importante fenomenologia foi inicialmente proposta pelo imunologista Peter Medawar, em 1953. Desde então, mesmo após cinco décadas de intensas pesquisas sobre a imunologia da reprodução, ainda não se conhece perfeitamente o mecanismo de adaptação imunológica presente na gestação, que permite o sucesso do enxerto placentário.

Estima-se que 50 a 70% das tentativas de engravidar falham. Estas falhas podem ocorrer no momento da fertilização, no trajeto do zigoto/blastocisto até o útero, na nidação do blastocisto no endométrio e no desenvolvimento normal da placenta. Dentro desta porcentagem, 10 a 20% podem ser atribuídas à infertilidade sem causa aparente (ISCA,) definida como a persistência de alguma alteração na fertilidade, após todas as possibilidades propedêuticas serem esgotadas (fatores masculinos, ovarianos, cervicais, tubéreos, peritoneais, corporais, coitais, vaginais e imunológicos já conhecidos) e 1 a 2% aos abortos espontâneos recorrentes (AER).

O AER, classicamente definido como três ou mais perdas fetais espontâneas e consecutivas antes da vigésima semana de gestação (STIRRAT, 1992), é um intrigante problema na prática obstétrica. Vários fatores etiológicos e regimes terapêuticos têm sido propostos, mas com poucas evidências de estar relacionado a um fator causal único. As causas mais comuns são as alterações genéticas, a deficiência de fase lútea, as alterações anatômicas uterinas, as infecções causadas principalmente por vírus, bactérias, protozoários, *Mycoplasma*; as trombofilias hereditárias e as imunológicas que representam 50% dos casos (COSTA et al, 1993; SOUSA et al, 1999; SOUSA et al, 2002; CAETANO et al., 2006).

Dentre os fatores imunológicos, estão incluídos a compatibilidade HLA-DR, os anticorpos antifosfolípídes, a produção de anticorpos maternos contra o DNA ou produtos de degradação do DNA paternos, os anticorpos anti-espermáticos, a atividade das células *natural killer* (NK), a atividade das células T inibidoras e reguladoras (SOUSA et al., 2002) e a ativação não controlada do Sistema Complemento (SC) (SALMON, 2004).

1.1 SISTEMA COMPLEMENTO

O SC consiste de um grupo de proteínas plasmáticas e de superfície celular que interagem de uma forma ordenada mediando importantes eventos relacionados às respostas imune e inflamatória do organismo. Constitui-se de mais de vinte proteínas distintas já conhecidas, que podem ser ativadas iniciando uma cascata de reações que resultam em atividades biológicas importantes como opsonização (facilitando a fagocitose), solubilização e inibição da deposição de imunocomplexos (IC), eliminação de IC, lise e morte de células e de microorganismos invasores, participação no processo

inflamatório, liberando peptídeos com destacada ação inflamatória, as anafilotoxinas, e no controle da resposta imune.

A maioria das proteínas do SC presentes no plasma é sintetizada no fígado pelos hepatócitos e fagócitos mononucleares. Já, a síntese de proteínas de superfície celular, é realizada pelos macrófagos (PERMULTER & COLTEN, 1986). Estas proteínas encontram-se no plasma na forma inativa ou como pró-enzimas.

1.1.1 Ativação do Sistema Complemento

A ativação deste sistema depende de fatores que alteram a homeostasia. Ocorre de maneira sequencial, por um mecanismo de cascata através de três vias conhecidas até o momento: a Via Clássica (VC), a Via Alternativa (VA) e a Via das Lectinas. Estas três vias enzimáticas funcionam através de reações em cascata entre as proteínas que as constituem e levam à formação de um complexo enzimático comum às três vias, chamado C3 convertase, que é capaz de ativar a molécula C3. Também, leva à geração de fragmentos protéicos, as anafilotoxinas, com atividade inflamatória destacada, responsáveis por induzir a permeabilidade vascular (COCHRANE & MULLER-EBERHARD, 1968; GORSKI, HUGLI & MULLER-EBERHARD, 1979), a quimiotaxia das células inflamatórias (DAFFERN et al., 1995; HARTMANN et al., 1997) e a contração da musculatura lisa (COCHRANE & MULLER-EBERHARD, 1968), e no final, à composição da via terminal não-enzimática, que culmina com a formação de um complexo citolítico denominado complexo de ataque à membrana (MAC) (IBORRA et al., 2003).

1.1.1.1 Via Clássica

A VC é iniciada pela interação do componente C1q do complexo C1 (C1q, C1r₂, C1s₂) com ICs ou agregados contendo anticorpos IgG

principalmente das subclasses IgG1 e IgG3 ou IgM. A união destes anticorpos aos antígenos leva à exposição de sítios ativos na porção Fc do anticorpo que permite a ligação com C1, formado por uma molécula de C1q e duas de C1s e duas de C1r, unidas por pontes não-covalentes dependentes de Ca^{2+} . A ligação de C1q com o anticorpo leva a mudanças conformacionais no complexo C1, que o libera da ação reguladora do inibidor de C1 (C1-Inh) (ZICCARDI, 1982), permitindo assim, que ocorra a auto-ativação de C1r, que por sua vez, cliva C1s ativando-o. Em seguida, através de uma reação dependente de Mg^{2+} , C1s ativa o componente C4, clivando-o em dois fragmentos, C4b e C4a. O fragmento menor, C4a se difunde no plasma. Em seguida C2 liga-se a C4b e também é ativado por C1s, originando dois fragmentos. O fragmento menor C2a se difunde no plasma e os fragmentos maiores (C4b e C2b) derivados da ativação de C4 e C2, formam uma enzima conhecida como a C3 convertase da VC (C4b2b), que é responsável pela ativação do 4º componente proteico do SC, C3. O resultado desta ativação é a formação de dois fragmentos, C3b e C3a. A remoção do fragmento C3a, que se difunde no plasma, induz mudanças conformacionais na porção C3b da molécula, expondo uma ligação tioléster interna que era inacessível na molécula nativa. A hidrólise dos radicais tiolésteres pela água, leva à inativação de C3b, o que ocorre na maioria dessas moléculas. Entretanto, aproximadamente 10% das moléculas de C3b formam ligações covalentes com as superfícies biológicas, através dos grupos hidroxila e amina, ou com C4b2b (C3 convertase). As moléculas que interagem com C4b2b formam uma nova enzima, a C5 convertase da Via Clássica (C4b2b3b), cujo substrato é a molécula de C5. C5 é clivada pela ação da C5 convertase originando dois fragmentos, C5b e C5a. C5a se difunde no plasma e C5b dá início à fase terminal da sequência de ativação do SC.

1.1.1.2 Via Alternativa

A VA difere da VC pela possibilidade de ativação sem a presença de anticorpos, indicando ser uma linha de defesa inata do organismo (PANGBURN & MÜLLER-EBERHARD, 1984). Pode ser ativada por polissacarídes de bactérias, alguns vírus, agregados de imunoglobulinas (IgA e IgE) e outros tipos de células alteradas. Além disto, a VA é ativada constantemente sob condições fisiológicas, mesmo em baixos níveis.

O início da ativação é espontâneo e está relacionado com a presença de duas formas alteradas de C3. A primeira é C3b, que geralmente é proveniente da ativação da VC. A segunda é C3(H₂O), que é gerado através da hidrólise espontânea da ligação tioléster localizada intramolecularmente na cadeia α da molécula nativa de C3, que leva a um rearranjo conformacional responsável pela formação desta molécula estruturalmente e funcionalmente semelhante à C3b (PANGBURN & MÜLLER-EBERHARD, 1984). O componente C3(H₂O) possui um sítio de ligação para o Fator B, permitindo a união do fator B à C3(H₂O). Uma protease plasmática, o fator D, na presença de íons Mg²⁺, cliva o fator B em dois fragmentos, Bb e Ba (LESVRE & MÜLLER-EBERHARD, 1978). O complexo resultante, C3bBb, é a C3 convertase da Via Alternativa, capaz de ativar a molécula de C3, originando novos fragmentos, C3b e C3a. C3a se difunde no plasma e C3b pode participar do processo de amplificação, onde gerar novas moléculas de C3b (PANGBURN, 1983), ou alguns fragmentos destas reações podem ligar-se aos complexos enzimáticos C3bBb, formando uma nova enzima proteolítica, a C5 convertase (C3bBb3b), capaz de ativar a molécula de C5, originando dois fragmentos, C5b e C5a. C5a se difunde no plasma e C5b dá início à fase terminal da seqüência de ativação do SC.

Entretanto, esta ativação espontânea da VA ocorre em percentuais muito baixos (0,2-0,4%/hora), e também é controlada por algumas proteínas (PANGBURN & MÜLLER-EBERHARD, 1983).

1.1.1.3 Via das Lectinas

Em 1975, observou-se que as proteínas encontradas nas células do fígado de mamíferos apresentavam afinidade pela manose, semelhante à exibida pelas lectinas. Três anos depois, elas foram purificadas de extratos hepáticos de coelho e no soro de humanos, bovinos e camundongos. Estava identificada então a MBL (mannose-binding-lectin) (TURNER, 1996). A Via das Lectinas também difere da VC pela possibilidade de ativação sem a presença de anticorpos. É iniciada na presença de Ca^{2+} , pela ligação do domínio tipo C de uma lectina sérica (Proteína Ligante de Manose – MBP) à N-acetilglicosamina, à D-manose, à L-fucose, à glicose e à galactose (MATSUSHITA & FUJITA, 1992; TURNER, 1996 e JANEWAY et al., 2000) encontradas na parede de bactérias Gram-negativas ou outras células. A MBL é muito semelhante estruturalmente e funcionalmente à C1q do complexo C1 encontrado na VC (ROSS et al., 2001). Ao se ligar aos açúcares na membrana de microorganismos, a MBL sofre uma modificação estrutural capaz de ativar as enzimas MASP-1 e MASP-2 formando o complexo enzimático chamado MBP-MASP (serina protease associada à MBP) (ROSS et al., 2001; FUJITA, 2002). O complexo MBP-MASP-1 é capaz de ativar o componente C3 do SC. Já, o complexo MBP-MASP-2 é capaz de ativar o componente C4 do SC, clivando-o em C4b e C4a. O fragmento maior C4b liga-se covalentemente à uma superfície ativadora e o fragmento menor, C4a, se difunde no plasma. Em seguida, C2 liga-se à C4b e também é ativado pelo complexo MBP-MASP-2, originando dois fragmentos, C2b e C2a (ROSS et al., 2001; FUJITA, 2002).

Após a ativação de C2, a cascata do complemento segue idêntica à ativação da VC (MAO et al., 2003).

MBP também atua como opsonina. Baixo nível de MBP no soro humano tem sido associado a defeitos de opsonização (MATSUSHITA & FUJITA, 1992).

1.1.1.4 Complexo de Ataque à Membrana (MAC)

É a Sequência Terminal da ativação do SC, idêntica nas três vias enzimáticas que resulta na deposição de um complexo denominado complexo de ataque à membrana (MAC). Este complexo se deposita sobre a membrana de células normais, de células infectadas por certos vírus e de certas linhagens tumorais além das superfícies de microorganismos (PANGBURN, 1983). As C5 convertases das VC, VA e Via das Lectinas iniciam a ativação dos componentes terminais do SC. Este processo tem início com a ativação do componente C5 pela C5 convertase, que corresponde à última etapa enzimática da cascata do SC. C5 é uma molécula homóloga a C3 e C4, porém isenta de radicais tiolésteres internos. Após sua ligação ao componente C3b da C5 convertase, C5 sofre fragmentação em uma fração menor e solúvel denominada C5a e uma fração maior denominada C5b, que permanece ligada à C5 convertase. O fragmento C5b possui uma conformação que permite sua ligação ao próximo componente da cascata, C6. O complexo estável C5b6 permanece associado à C5 convertase até sua ligação com C7, resultando na formação do complexo C5b67, que é liberado da C5 convertase. Esta liberação causa uma alteração conformacional que expõe um sítio hidrofóbico neste complexo recém liberado, tornando-o altamente lipofílico. Esta alteração permite sua inserção na bicamada lipídica da membrana celular, tornando-o um receptor de alta afinidade para C8. O complexo C5b678 insere-se mais

profundamente na membrana, atravessando-a, e apresenta atividade lítica inicial sobre alguns microorganismos e células eucariotas. O último componente da cascata é C9, uma proteína sérica que sofre polimerização quando ligada ao complexo C5b678, que resulta na atividade lítica muito mais eficiente. A associação entre doze a dezoito moléculas de C9 (MORGAN & HARRIS, 1999) formam poros na membrana, estes poros permitem o intercâmbio de pequenas moléculas solúveis, íons e água entre os meio intra e extra-celulares, culminando com grande influxo de água e consequente lise osmótica (PODACK, 1984).

1.1.2 Regulação do Sistema Complemento

O SC é regulado em múltiplos pontos. A importância desta regulação pode ser observada pelo fato de existirem tantas proteínas reguladoras do SC quanto os componentes participantes da sua ativação.

Embora o SC promova uma defesa poderosa contra organismos invasores, sua ativação gerar uma variedade de produtos citotóxicos e citolíticos que representam um perigo potencial para as células autólogas, necessitando ser cuidadosamente controlado. A importância desta regulação se deve ao fato de o SC ser continuamente ativado, embora em pequena proporção, em todos os humores do corpo e de as vias de ativação do SC serem cascatas proteolíticas, com predisposição à amplificação. Deste modo, o controle é essencial para evitar o dano tecidual e o consumo rápido do complemento em resposta a estímulos triviais.

A regulação é realizada por proteínas reguladoras plasmáticas e proteínas ligadas a membranas (CRPs), que agem em diversos pontos da cadeia de reações para regular sua ativação e impedir que haja auto-consumo deste sistema em atividades desnecessárias ou prejudiciais ao hospedeiro. A

eficácia deste controle se deve, em parte, à meia-vida curta de alguns complexos protéicos, que rapidamente são inativados e à alta especificidade de suas enzimas controladoras (MOLLNES & LACHMANN, 1988).

1.1.2.1 Proteínas Reguladoras Solúveis

As CRPs de fase fluída ou plasmáticas, já conhecidas, são: proteína inibidora de C1-esterase (C1-Inh), Fator I, Fator H, *C4-binding protein* (C4bp), Clusterina (SP-40,40), Proteína S (Vitronectina), Properdina (somente na VA) e inativador de anafilotoxinas (carboxipeptidase N).

C1-Inh é uma serino-protease de cadeia simples com aproximadamente 104kDa, alto índice de glicosilação (30%) (BOS et al., 2002) e com capacidade para inibir várias serino-proteases do SC (C1r, C1s, MASPs), do Sistema de Coagulação e do Sistema Fibrinolítico através de seu domínio serpina caracterizado por três β -camadas e uma alça reativa móvel que bloqueia a atividade enzimática destas proteases. Em função desta propriedade, C1Inh age como supressor da inflamação e na regulação da permeabilidade vascular. (CICARDI et al., 2005; DAVIS, MEJIA & LU, 2008).

Fator I é uma glicoproteína formada por duas cadeias que juntas possuem 88kDa. A cadeia pesada (50kDa) é responsável pela interação com os co-fatores enquanto a cadeia leve (38kDa) contém o sítio catalítico serino-proteinase (DISCIPIO, 1992) que cliva o fragmento C3b em iC3b e posteriormente em C3c e C3d regulando assim a ativação de C3 e sua alça de amplificação. Também controla a ativação de C4, clivando-o em iC4b e posteriormente em C4c e C4d. Entretanto, o Fator I só pode funcionar com a colaboração de outras proteínas atuando como cofadoras, Fator H, C4bp, MCP, CR1 (MORLEY & WALPORT, 2000).

Fator H é uma glicoproteína de cadeia única e 150kDa que age somente na VA (DISCIPIO, 1992). Atua como cofator para o Fator I na clivagem de C3b em iC3b, como inibidor da C3 convertase através da competição com o Fator B na ligação com C3b e promove a dissociação da C3 convertase e C5 convertase através do deslocamento de Fator B ou Bb já ligados (DISCIPIO, 1992, MORGAN & HARRIS, 1999).

C4bp é proteína oligomérica de 500kDa, composta por sete cadeias α idênticas e uma β unidas por pontes de dissulfeto, organizadas em *Short Consensus Repeats* (SCRs). Sua função é controlar C4b, inibindo a ativação da VC e acelerando o decaimento da C3 convertase (C4b2b) em conjunto com o Fator I (SIM et al., 1993; BLOM et al., 2004).

Clusterina e Vitronectina competem com o componente C8 pela ligação com o complexo C5b-67 associado à membrana, inibindo a formação do MAC (PODACK et al., 1977; PODACK et al., 1984).

Properdina é uma β -globulina solúvel, descoberta por PILLERMER et al (1956). É encontrada no plasma sob a forma inativa de oligômeros, aproximadamente 80% destes oligômeros são dímeros, trímeros e tetrâmeros (SMITH et al., 1984), que são formados a partir de monômeros com peso molecular de 53kDa (TRUEDSSON et al., 1997). Funcionam como reguladoras da ativação da VA, e são ativadas quando se ligam a C3b através de uma mudança conformacional que estabiliza a C3 convertase (C3bBb) e a C5 convertase (C3bBb3b) e assim aumenta seu tempo de vida de 1,5 minutos para aproximadamente 18 minutos a 37°C (WEILLER et al., 1976; SMITH et al., 1984), e também inibe, por competição, a ligação do Fator I a C3b (MEDICUS et al., 1976).

Inativador de anafilotoxinas (C3a, C4a e C5a) ou carboxipeptidase N remove a arginina na porção C-terminal das anafilotoxinas eliminando ou diminuindo o poder inflamatório destes fragmentos (GERARDI & HUGLI, 1981).

1.1.2.2 Proteínas Reguladoras Ligadas à Membrana Celular

As proteínas ligadas à membrana, até então conhecidas são: receptor para C1q, receptor de complemento tipo 1 (CR1/CD35), receptor de complemento tipo 2 (CR2), receptor de complemento tipo 3 (CR3), receptor de complemento tipo 4 (CR4), *membrane cofactor protein* (MCP/CD46), *decay accelerating factor* (DAF/CD55), CD59, *homologous restriction factor* (HRF), receptor para C3a, C4a e C5a.

CR1 é uma glicoproteína transmembrana com pelo menos quatro isoformas (A, B, C e D), com pesos moleculares variando de 190 kDa a 280 kDa. Em todas as isoformas a porção extracelular é composta por cinco a oito SCRs, dependendo da isoforma. Expressa em quase todas as células sanguíneas exceto plaquetas, células NK e linfócitos T. Nos tecidos pode ser encontrada nas células dendríticas e glomerulares (HOURCADE et al., 2000). Atua como cofator para o Fator I na clivagem de C3b e C4b, na clivagem do iC3b e no aumento da velocidade de decaimento da atividade das C3 e C5 convertases da VC e VA. Fora de sua atividade no SC, CR1 atua como mediador da fagocitose de partículas opsonizadas por C3b e no transporte de ICs (MORGAN & MERI, 1994; LISZEWSKI et al., 1996).

MCP é uma glicoproteína transmembrânica composta por quatro SCRs com peso molecular variando de 46kDa a 65kDa dependendo da isoforma. Liga-se a C3b facilitando a primeira clivagem deste pelo Fator I (NANGAKU, 1998). Entretanto, não age como cofator para as clivagens subseqüentes do iC3b. MCP liga-se fracamente a C4b e, conseqüentemente, apresenta menor

atividade de cofator em sua clivagem. Encontra-se amplamente distribuída, estando presente em todas as células circulantes exceto eritrócitos, além de uma variedade de outras células como as epiteliais, endoteliais, fibroblastos, espermatozóides e trofoblasto placentário (CERVONI et al., 1992; HSI et al., 1991; COLE et al., 1985).

HRF é uma proteína de 65 kDa que se encontra amplamente distribuída pelo organismo e se liga ao complexo C5b-8 ou C5b-9, especificamente à C8 e C9 inibindo a polimerização de C9 já inserido na membrana, impedindo assim a formação do MAC (ROLLINS & SIMS, 1990; TANDON et al., 1994; LEHTO et al., 1995).

1.1.2.2.1 Fator Acelerador de decaimento (DAF)

DAF é uma glicoproteína de 70 KDa composta por quatro *short consensus repeats* (SCRs) (NICHOLSON-WELLER & WANG, 1994), que está ancorada à membrana de todas as células circulantes, endotélio vascular, placenta (HOLMES et al., 1990) e em um grande número de células epiteliais (ASCH et al., 1986; MEDOF et al., 1987) através da ligação com moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GPI) presentes nestas membranas celulares (NICHOLSON-WELLER et al., 1982). Também está presente na forma solúvel em vários fluidos orgânicos como plasma, lágrima, saliva, líquido sinovial e cerebrospinal (MEDOF et al., 1987). Entretanto, a forma solúvel não é capaz de se incorporar à membrana celular, indicando a possível perda da âncora de GPI.

Foi descoberta por Hoffman em 1969 ao inibir a lise de eritrócitos de carneiro e permanecer em soluções de extratos de hemácias humanas (LUBLIN & ATKINSON, 1989).

DAF possui atividade regulatória, atua ligando-se a C4b e C3b inibindo sua formação ou dissociando-os de C2b e Fator B respectivamente, prevenindo assim, a formação da C3 convertase e da C5 convertase das VC e VA e conseqüentemente a ativação destas vias (IBORRA et al., 2003). DAF apresenta alta afinidade por C4b e C3b quando estes fragmentos estão fazendo parte da C3/C5 convertases (KINOSHITA, 1986).

1.1.2.2.2 CD59

CD59 é uma glicoproteína de 18-20 KDa, que também é ancorada à membrana celular através do GPI. Está presente em todas as células circulantes, células glomerulares, células epiteliais, endoteliais e espermatozóides (MERI et al., 1991; BROOIMANS et al., 1992). Na gestação, CD59 está presente no sítio de contato com o sangue materno e ao redor do citotrofoblasto e em seus derivados extravilosos (MERI et al., 1991; HOLMES et al., 1992). HOLMES et al., (1992) encontraram que CD59 é mais abundante em placentas de início de gestação do que o DAF. As formas solúveis de CD59 foram encontradas na lágrima, suor, saliva, leite, plasma, líquido amniótico, plasma seminal (MERI et al., 1991; ROONEY et al., 1992) e na urina (DAVIES et al., 1989). Este CD59 solúvel não é incorporado à membrana e não tem nenhuma atividade inibitória, que sugere a perda de sua âncora de GPI (ROONEY et al., 1992).

Esta glicoproteína foi descoberta por SUGITA et al. (1988) através da purificação, por um protocolo não convencional que combinava a cromatografia clássica e a eluição por Western-Blots, de uma pequena proteína inibidora do SC.

CD59 se liga à cadeia α de C8 e ao domínio C9b de C9 no MAC (NINOMYA & SIMS, 1992), impedindo sua incorporação na membrana,

polimerização e conseqüentemente a formação final do MAC e a lesão lítica (ROLLINS & SIMS, 1990; LANDI et al., 2003; IBORRA et al., 2003).

Abaixo segue-se uma representação simplificada da ativação e controle do SC.

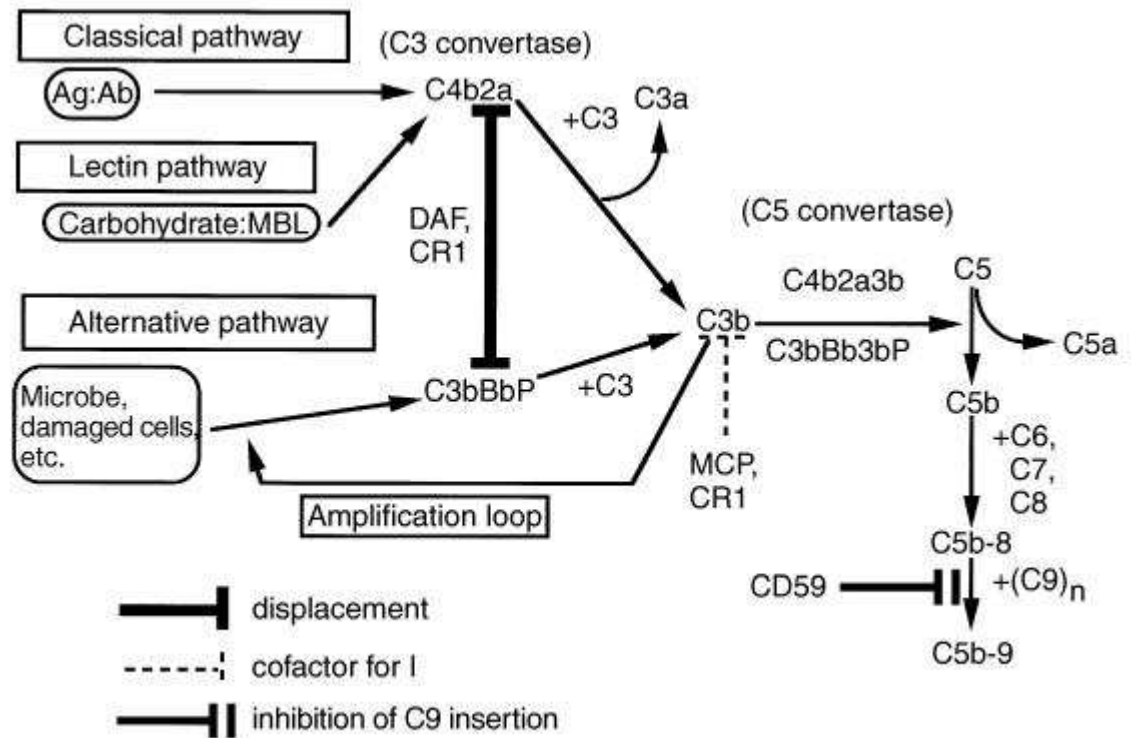


Figura 1: Ativação e Regulação do SC (NANGAKU, 1998).

1.2 SISTEMA COMPLEMENTO E O SISTEMA REPRODUTIVO

A deposição de espermatozoides, que são antigenicamente estranhos, no trato genital inferior feminino faz com estes entrem em contato com a mucosa vaginal e iniciem o primeiro estímulo à resposta imune. A mucosa vaginal faz parte do Sistema Imunológico das mucosas e é importante para a proteção contra microorganismos transmitidos sexualmente (SOUSA et al., 1997). O plasma seminal contém proteínas do SC como C3b e iC3b e CRPs, como C1Inh, MCP, DAF e CD59, nas formas solúvel e de membrana (JIANG & PILLAI, 1998; FENICHEL et al., 1995; ROONEY et al., 1992; VANDERPUYE et

al., 1992; BOZAS et al., 1993). Algumas proteínas presentes no plasma seminal podem ativar o SC pela VA ou pela VC que leva à formação de mais frações C3b e iC3b. Entretanto, CRPs como DAF e CD59, localizadas na membrana plasmática acrossômica, parecem proteger o espermatozóide contra os danos desta possível ativação do SC durante a migração dos espermatozóides pelo trato genital feminino (FENICHEL et al., 1994; CUMMERSON et al., 2006). Esta migração resulta em uma modificação estrutural na cabeça do espermatozóide, reação acrossômica, que acaba por expor a CRP MCP, localizada na membrana interna acrossômica do espermatozóide (TAYLOR & JOHNSON, 1996; CUMMERSON et al., 2006).

A própria ovulação, liberação do ócito e do fluido folicular, também pode estar associada com a possível ativação e regulação do SC, visto que, o fluido folicular possui grandes quantidades de C3b e iC3b e o oócito apresenta em sua membrana plasmática, inúmeros inibidores do SC, como CR1, CR2, CR3, MCP, DAF e CD59 (FENICHEL et al., 1995; TAYLOR & JOHNSON, 1996). As tubas uterinas possuem MCP, DAF, CD59 e o muco cervical possui formas solúveis de DAF e CD59 (JENSEN et al., 1995; IBORRA et al., 2003).

No trato reprodutor feminino, com o decorrer do ciclo menstrual, ocorre a transformação da superfície endometrial e a decidualização, processo influenciado principalmente pelos hormônios esteróides ovarianos (GIUDICE & FERENCZY, 1996) e que se caracteriza por mudanças morfológicas e funcionais nos tecidos endometriais glandulares incluindo várias etapas, entre elas a remodelação tecidual e vascular. Um destes hormônios é a progesterona, predominante na fase secretória do ciclo menstrual. A progesterona está implicada no aumento da secreção do componente C3 do SC (VANDERPUYE et al., 1992; HASTY et al., 1994; SAYEGH et al., 1996),

visto que, nesta fase ocorre a “janela de implantação”, uma abertura da barreira epitelial do endométrio que permite acomodar o blastocisto. Sem este aumento de C3, o organismo materno ficaria potencialmente vulnerável a infecções durante este período. Vários estudos apontam para presença do componente C3 (BISCHOF et al., 1994; ISAACSON et al., 1990) nas células das glândulas endometriais e no estroma endometrial predominantemente na fase secretória do ciclo menstrual (HASTY et al., 1994; SAYEGH et al., 1996). Em adição, parece haver aumento da expressão genética dos componentes C1r, C1s e C3 do SC no endométrio durante esta fase (SCHIMDT et al., 2005).

Além do mais, há evidências de que a progesterona também influencia a secreção de alguns inibidores do SC, como o DAF (YOUNG et al., 2002). Recentemente demonstrou-se que a expressão de DAF coincide com os níveis de progesterona, visto que pacientes com defeitos de fase lútea tinham menor expressão de DAF quando comparadas a mulheres normais e essas, quando tratadas com progesterona, retornavam aos níveis normais de expressão de DAF (KAUL et al., 1995; YOUNG et al., 2002). Além disto, outros inibidores do SC, C1-Inh, C4bp, clusterina e o próprio DAF (LOBO et al., 2004), apresentaram expressão genética mais pronunciada neste período, indicando que um estreito controle do SC, provavelmente, tenha por finalidade controlar sua ativação exacerbada (SCHMIDT et al., 2005; NOGAWA FONZAR-MARANA et al., 2006).

A interação espermatozóide-oócito pode ocorrer através da ligação cruzada entre o MCP do acrossomo do espermatozóide e do oócito mediada pelos fragmentos de C3 presentes no fluido folicular (TAYLOR et al., 1994). Em torno de seis a sete dias após a fecundação, inicia-se o processo de implantação do blastocisto. O sucesso da implantação dependerá de uma

comunicação apropriada entre o blastocisto e o endométrio e um útero adequadamente preparado pela ação hormonal, principalmente da progesterona. O blastocisto (semi-alogênico) em contato com C3 ativa, provavelmente, a VA do SC, causando uma microinflamação local que, em parte, auxilia na implantação embrionária. Esta ativação durante a nidação deve ser controlada, para que não ocorra lise do blastocisto e perda precoce do embrião.

Foi observado o aumento da expressão de algumas CRPs como: C1Inh, C4bp, DAF, CD59 e clusterina indicando uma adequada proteção materna contra a possível ativação descontrolada do SC, durante este curto período da janela imunológica. Este aumento indica, provavelmente, uma forte regulação do SC com a finalidade de controlar sua ativação (SCHMIDT et al., 2005; NOGAWA FONZAR-MARANA et al., 2006).

O endométrio é capaz de sintetizar grande variedade de proteínas e inibidores do SC, que têm relevante função na implantação. Para que este processo ocorra, é necessário haver um equilíbrio na regulação dos diversos genes que estão sob controle dos hormônios esteróides e de fatores reguladores locais parácrinos e autócrinos (TABIBZADEH, 1998; REESE et al., 2001). Embora vários mecanismos já sejam conhecidos, o papel desempenhado pelas proteínas e inibidores do SC ainda necessita ser melhor estudado.

No momento da implantação embrionária, ocorre a adesão do trofoblasto ao epitélio uterino e a sua penetração na decídua materna e nas artérias espiraladas. As células maternas e fetais ficam lado a lado dentro da decídua, sem, porém ocorrer efeitos deletérios para ambas as partes (COULAN et al., 1992). O trofoblasto forma uma barreira física de vilosidades coriônicas entre o

feto e a mãe (GIRARDI et al., 2006a). O feto representa algo estranho ao organismo materno, uma vez que apresenta antígenos de origem paterna distintos daqueles de sua progenitora as quais, segundo os princípios da Imunologia, suscitam uma resposta imune tanto inata quanto adquirida (GIRARDI et al., 2006a). De fato, existe na literatura um consenso de que durante a gestação, o organismo materno desenvolve uma resposta imune ao feto, tanto no âmbito local quanto no sistêmico.

No âmbito local, esta exposição direta das células trofoblásticas ao sangue materno, que circula nos espaços intervilosos, as coloca em risco de serem atacadas por produtos da ativação do SC, que são liberados localmente. O dano mediado pelo SC no trofoblasto gera fragmentos de complemento que podem se ligar aos tecidos e recrutar células efetoras potentes podendo levar à inflamação, necrose tecidual com consequente destruição celular (CAUCHETEUX, KANELLOPOUS-LANGEVIN & OJCIUS, 2003; SALMON, 2004), além de infecções causadas pela abertura da permeabilidade da barreira trofoblástica que permite a entrada de bactérias, vírus e outras moléculas tóxicas que podem comprometer a sobrevivência fetal (GIRARDI et al., 2006a). Além disto, o próprio remodelamento que ocorre nas artérias espiraladas com a invasão do trofoblasto na decídua favorece a ativação local do SC. Esta alteração vascular parcial é caracterizada pela substituição das células endoteliais pelas células trofoblásticas extravilosas e está associada à deposição de fibrina na decídua, à ruptura da lâmina elástica interna e à perda gradual de células musculares lisas (GIRARDI et al., 2006a).

Apesar disto, atualmente, há um consenso de que a ativação do SC e consequente deposição de seus componentes na placenta e nas artérias espiraladas da decídua é um processo fisiológico, visto que a ativação do

complemento pode ser observada através da presença de seus produtos em gestações normais e nas patológicas (SINHA et al., 1984; TEDESCO et al., 1990). Entretanto, os mecanismos que iniciam esta ativação no endométrio não estão claros (GIRARDI et al., 2006b). Frequentemente, C1q e C4, se depositam nos vasos sanguíneos fetais e C3d e C9 no trofoblasto. Isto sugere que o SC pode ser ativado por diferentes vias e em diferentes áreas das vilosidades coriônicas (ANDREW et al., 1993; GIRARDI et al., 2006a). VAN DE GEIJN et al. (2007), provaram que ocorre um aumento da atividade da Via das Lectinas e das concentrações séricas de MBL em gestantes durante toda gravidez. Também identificaram o aumento da atividade do complexo enzimático MBL-MASP nestas gestantes. Como consequência destas ativações ocorre a resposta imune sistêmica onde há aumento dos níveis plasmáticos dos componentes do SC. RICHANI et al. (2005) encontraram, os níveis plasmáticos de C3a, C4a e C5a, aumentados em gestantes quando comparadas a não gestantes, sendo que este aumento de concentração não variou com a idade gestacional.

Embora componentes ativados do SC estejam presentes na placenta de gestações normais, a ativação do SC parece ser controlada, com sucesso, por três CRPs presentes no trofoblasto, DAF, MCP e CD59. A partir da 6ª semana de gestação já é possível encontrá-las (HOLMES et al., 1992; HOLMES & SIMPSON, 1992). Geralmente estão, estrategicamente, expressas na superfície trofoblástica que estão em contato com o sangue e tecido materno e sua expressão durante a gestação parece ter um importante papel na proteção fetal. Sendo assim, qualquer alteração na interface materno-fetal pode acarretar na expulsão do feto (GIRARDI et al., 2006b).

O controle apropriado do SC é um passo fundamental para a gestação e tem sido demonstrado através dos resultados com camundongos deficientes de Crry, uma proteína como DAF e MCP, que regula o SC bloqueando a ativação de C3 e C4. Estes apresentaram deposição do componente C3 na placenta e consequente mortalidade fetal (XU et al., 2000; MOLINA, 2002).

Deste modo, conhecer a expressão das proteínas e inibidores do SC que controlam os eventos moleculares envolvidos no desenvolvimento e na manutenção de um endométrio receptivo é fundamental para se compreender o processo de implantação e desenvolvimento embrionário. A avaliação das proteínas e inibidores do SC expressas em endométrios, durante a janela de implantação em mulheres com infertilidade confirmada, possibilita novas estratégias diagnósticas e clínicas mais complexas do que a simples datação endometrial, que possui baixo valor preditivo para fertilidade, uma vez que está sujeita a variações entre ciclos de uma mesma paciente, além das análises, feitas por distintos observadores, variarem de 20% a 40% (STROWITZKI et al., 2006).

Recentemente, várias descobertas têm evidenciado a ativação do SC em casos de aborto espontâneo recorrente (PENNESI et al., 1998; GIRARDI et al., 2008).

1.3 ABORTO ESPONTÂNEO RECORRENTE (AER)

Define-se aborto espontâneo recorrente como três ou mais perdas conceptuais consecutivas e espontâneas até a 20ª semana de gestação ou o peso fetal atingir 500g (EDMONDS et al., 1982; STIRRAT, 1990). Sua incidência é de 1 a 2% entre os casais que tentam ter filhos (DUDLEY & BRANCH, 1989). Antigamente a detecção da causa do AER só ocorria na minoria dos casos. Com o decorrer dos anos, procurou-se estudar as possíveis

causas em busca de alternativas que pudessem produzir melhores resultados gestacionais. Em praticamente metade dos casos a causa permanece desconhecida (COSTA et al., 1993), sugerindo a necessidade de novos caminhos para a elucidação.

O AER pode ser denominado primário, quando a paciente não teve nenhuma gestação a termo, ou secundário, quando a história obstétrica indicar pelo menos um feto vivo viável precedendo a seqüência de abortos. Esta divisão é importante, pois estes dois grupos apresentam comportamentos epidemiológicos e imunológicos distintos (STIRRAT, 1990).

Dentre as causas já conhecidas de AER podemos citar as genéticas, anatômicas, hormonais, infecciosas e imunológicas. Fatores imunológicos parecem desempenhar importante papel (HILL, 1992), em casos onde a etiologia dos abortos é desconhecida. Entre as causas não elucidadas, as auto e/ou aloimunes foram encontradas em mais de 80% dos casos (McINTYRE et al., 1989). Considerado que a coexistência materno-fetal expressa uma resposta adequada, mas desconhecida do ponto de vista imunológico, várias pesquisas têm sido realizadas no campo da Imunologia Reprodutiva com intuito de desvendar o enigma da gestação e de seus distúrbios. Deste modo, alguns mecanismos têm sido propostos como a ação das células T regulatórias (ALUVIHARE, KALLIKOURDIS & BETZ, 2004), da enzima *indolamine 2,3 dioxygenase* (IDO) (MUNN et al., 1998) e das proteínas reguladoras do SC (XU et al., 2000).

Atualmente, o AER tem sido atribuído a uma resposta imune materna descontrolada contra os antígenos fetais (HILL, POLGAR & ANDERSON, 1995). Especificamente, a ativação do SC tem sido associada à mortalidade embrionária (XU et al., 2000; GIRARDI & SALMON, 2003; MAO et al., 2003).

Estudos em animais demonstraram que a deficiência de Crry, uma proteína de membrana reguladora do SC expressa no trofoblasto dos camundongos, que age regulando a C3 convertase, resultava em mortalidade embrionária e deposição de proteínas do SC e infiltração de células inflamatórias na placenta (XU et al., 2000). Além do mais, camundongos *knock-out* para o componente C5 e a neutralização de C5a com anticorpos contra esta anafilotoxina ou contra seu receptor, preveniram o dano fetal e a perda gestacional em modelos animais de perda gestacional independente de anticorpos (GIRARDI et al., 2003), visto que a presença de C5a pode causar deficiência na regulação dos fatores angiogênicos que são necessários para o desenvolvimento de uma placenta normal (GIRARDI, 2008). Estes achados indicam que um desequilíbrio entre os componentes e a atividade do SC poderia ser a causa de problemas na implantação e na gestação em humanos.

Estudos feitos em pacientes com AER têm demonstrado alterações do SC como deposição de C3d e C9 nos vasos da placenta (GIRARDI et al., 2006a), presença de hipocomplementenemia na ausência de autoanticorpos (MICHELOUD et al., 2007), altos títulos séricos de C5a (RICHANI et al., 2005), presença de uma variante do alelo de C4b (PENNESI et al., 1998) e redução da concentração sérica de C3 e Fator B, tudo levando a crer que o SC estaria ativado nestas pacientes (CUNNINGHAM & TICHENOR, 1995; TICHENOR et al., 1995). Além disto, o aumento da deposição de componentes do SC também é visto em placenta de pacientes com anticorpos antifosfolípidos (SHAMONKI et al., 2007). Recentemente, estudos com modelos animais envolvendo complicações da gravidez identificam ativação do SC como um modelo crucial de dano tecidual (GIRARDI et al., 2008).

Baseado nestas evidências de que a ativação do SC deve ser controlada para que ocorra a gestação normal, surgiram hipóteses de que a presença de anticorpos direcionados contra antígenos de superfície no trofoblasto pode ativar a VC do SC em pacientes com AER. Com isto, o SC tem sido associado ao mecanismo de mortalidade embrionária em casos de Síndrome de Anticorpos Antifosfolípides (SAAF) (COWCHOCK et al., 1986; GIRARDI et al., 2008).

1.3.1 Síndrome de Anticorpos Antifosfolípides (SAAF)

A SAAF foi descrita pela primeira vez por Hughes em 1983 e é caracterizada pela ocorrência de trombose arterial e venosa, trombocitopenia e complicações gestacionais, incluindo restrição do crescimento fetal e morte, causada pela presença de anticorpos antifosfolípides (LOCKSHIN et al., 2000; LEVINE et al., 2002) RAI et al., (1995) observaram que a SAAF estava presente em 15% das pacientes com abortamento habitual versus 2% no controle. A perda fetal pode ser de até 90% das gestações quando nenhum tratamento farmacológico é empregado. O mecanismo da perda não está completamente esclarecido e parece estar ligado à trombose dos vasos úteros-placentários, infarto placentário e algumas alterações no processo de implantação (STHOEGER et al., 1993).

Os anticorpos antifosfolípides são imunoglobulinas que reagem contra fosfolípides, carregados negativamente, presentes na membrana. O início de sua identificação laboratorial data de 1906, quando foi realizada a primeira fixação de complemento, utilizando, como antígeno, extratos de fígado de fetos com sífilis. Em seguida, surgiu uma segunda geração de métodos de identificação laboratorial com técnicas de fixação de complemento e floculação,

como o *Venereal Disease Research Laboratory* (VDRL), onde se utilizava como antígeno, uma combinação de cardiolipina, lectina e colesterol.

Altas taxas de anticorpos antifosfolípidos são encontradas em 30-40% das pacientes com história de abortos recorrentes (CARRINGTON et al., 2005; HAHN et al., 2006). Os principais anticorpos antifosfolípidos incluem os anticorpos anticardiolipina, antifosfatidilinositol, antifosfatidilserina, antifosfatidilglicerol, antifosfatidiletanolamida, anti-protrombina, anticoagulante lúpico e anti- β 2-glicoproteína I, que se encontram dirigidos contra fosfolípidos ou complexos de proteínas plasmáticas ligadas a fosfolípidos. Uma destas proteínas plasmáticas é a β 2-glicoproteína I (β 2-GPI) que está localizada no citotrofoblasto extraviloso e no sinciciotrofoblasto e possui alta afinidade de ligação aos anticorpos antifosfolípidos. Esta ligação tem efeitos sobre a agregação plaquetária, a atividade da protrombinase plaquetária e a via intrínseca da coagulação, induzindo assim um fenótipo pró-inflamatório (HAHN et al., 2006).

Algumas características dos anticorpos antifosfolípidos como a inibição da secreção da gonadotrofina coriônica e da proliferação do trofoblasto, a redução do poder de invasão do trofoblasto extraviloso e das artérias espiraladas materna que resultam na apoptose da placenta, prejudicando o desenvolvimento embrionário, são observadas tanto em placentas que sofreram aborto espontâneo quanto em estudos *in vitro* com células trofoblásticas. Possivelmente, a ação direta dos anticorpos antifosfolípidos no trofoblasto é mediada pelo SC. Esta hipótese vem sendo confirmada através de experimentos com camundongos deficientes de C3, C4, C5 e Fator B, injetados com anticorpos antifosfolípidos humano, que foram resistentes ao dano fetal induzido por estes anticorpos (BRANCH et al., 1989; GIRARDI & SALMON,

2003). Além do mais, a inibição do SC *in vivo*, quando se utilizou um inibidor da C3 convertase, Crry-Ig, preveniu o dano fetal e a restrição do crescimento intra-uterino. Deste modo, supõe-se que os anticorpos antifosfolípidos ativam o SC, tanto pela VC quanto pela VA, e o aumento local dos fragmentos do SC é altamente deletério para o desenvolvimento fetal (HOLERS et al., 2002; GIRARDI et al., 2003). Outro exemplo disto é a ativação do componente C5. (XU et al., 2000; GIRARDI et al., 2003). A clivagem do componente C5, com consequente liberação da anafilotoxina C5a resultante desta ativação, ocasiona perdas gestacionais e é também a responsável pela alteração no equilíbrio dos fatores angiogênicos que resultam no desenvolvimento anormal da placenta. GIRARDI et al. (2003) demonstraram que o bloqueio de C5a e de seu receptor, por anticorpos ou por peptídeos, previne complicações gestacionais. Já em humanos, encontrou-se que pacientes com SAAF apresentavam maior deposição de C4d e C3b nos trofoblastos (SHAMONKI et al., 2007).

Baseado nestes resultados, provavelmente os anticorpos antifosfolípidos alvejem a decídua e a placenta ativando o SC através da VC. Esta ativação leva a geração de potentes anafilotoxinas, C3a e C5a, e de mediadores inflamatórios como TNF- α , que recrutam células inflamatórias. Este recrutamento acelera a ativação da VA local e cria uma alça de amplificação inflamatória que aumenta a ativação e deposição do componente C3 na placenta, além de gerar mais C3a e C5a, que culminará com influxo de mais células inflamatórias para a placenta. O resultado deste influxo pode ser a morte intra-útero ou a restrição do crescimento fetal (GIRARDI & SALMON, 2003).

Vários estudos vêm tentando categorizar os casos de AER. KANERIA & VIHWANATHAN (1999) tentaram resumir a prevalência de anticorpos

antifosfolípides em diferentes populações e encontraram que 5,3% das pacientes obstétricas normais, 24% das mulheres submetidas a vários ciclos de fertilização in vitro (FIV), 38% das mulheres com Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) e 28% das mulheres com AER possuíam anticorpo antifosfolípides. QUENBY & FARQUHARSON (1993) encontraram que mulheres com oligomenorréia, acima de 30 anos, com mais do que quatro abortos e com títulos elevados de anticorpo anticardiolipina apresentaram diminuição da taxa de sucesso na gestação subsequente.

Um estudo multicêntrico observacional e prospectivo está sendo realizado para uniformizar os achados em perda gestacionais por anticorpos antifosfolípides, visto que a maioria dos estudos clínicos não possui concordância na definição de perda gestacional, não há divisão entre os casos de perdas precoces e tardias, não há separação entre positividade por anticorpos anticardiolipina e por anticoagulante lúpico e nem prova da persistência destes anticorpos e, além disto, também não há uma definição se o tratamento deve começar antes ou depois da concepção e se deve ser interrompido antes do parto. O chamado PROMISSE ((Predictors of pRegnacy Outcome bioMarkers in antlphospholipid antibody Syndrome and Systemic lúpus Erythematosus) tentará trazer estas resposta além de determinar se a ativação do SC precede a perda gestacional em mulheres com anticorpos antifosfolípides *versus* o controle de gestantes normais (GIRARDI, 2006; PETRI & QAZI, 2006).

Em virtude de que não existem avaliações prévias na literatura que descrevam a expressão do MAC e das proteínas reguladoras do complemento no endométrio de mulheres com AER, nosso interesse foi estudar e analisar

morfometricamente a expressão de C5b-9, DAF e CD59 nestas situações patológicas.

2 OBJETIVO

Avaliar a expressão do neoantígeno de C9, DAF e CD59 no endométrio secretor de mulheres diagnosticadas como inférteis por aborto espontâneo recorrente e comparar com a observada no endométrio secretor de mulheres férteis normais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

3.1.1 Pacientes

3.1.1.1 Grupo Aborto

Este grupo foi composto por mulheres voluntárias, com idades entre 18 e 40 anos, catalogadas com duas ou mais perdas fetais de repetição pelo Setor de Reprodução Humana, do Departamento de GO do HC da FMRP, USP. Foram selecionadas 70 mulheres atendidas no período de junho de 2007 a outubro de 2008 com esta queixa. Destas, vinte e cinco se encaixavam nos critérios de inclusão e foram convocadas para possível participação no estudo a comparecerem ao Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Departamento de GO do HC da FMRP, USP. Somente dezenove aceitaram participar do projeto e do total de dezenove biópsias colhidas, apenas treze estavam na fase secretória do ciclo menstrual.

Os critérios de inclusão foram mulheres com duas ou mais perdas gestacionais recorrentes sem causa aparente ou associadas à Síndrome dos Anticorpos Antifosfolípides (SAAF), com ciclo ovulatório normal, após exclusão de outras causas, de acordo com protocolo de investigação, que incluía: dosagens de FSH, LH, PRL no terceiro dia do ciclo menstrual; TSH; glicemia de jejum; hemograma com contagem de plaquetas; anticorpo antitireoglobulina e antiperoxidase; fator antinúcleo (FAN), anticorpos anticardiolipina (ACA) e anti β 2-glicoproteína I (anti - β 2GPI). Pesquisa do inibidor lúpico (anticoagulante lúpico) por três técnicas diferentes: PIL (pesquisa do inibidor lúpico), TCK e DrvVP, determinação de FV Leiden e FII G20210A. VDRL, HBsAg, HCV, Anti HIV, RIF para toxoplasmose e sorologia para rubéola;

citologia cérvico-vaginal e swab endocervical; espermograma e espermocultura; ultra-som transvaginal; cariótipo do casal; histerossalpingografia; histeroscopia; laparoscopia e teste com velas de Hegar se suspeita clínica de insuficiência istmo-cervical..

Os critérios de exclusão foram: mulheres que estivessem utilizando hormônios sexuais ou outras medicações, portadoras de doenças infecto-contagiosas com possibilidade de transmissão vertical, amostras endometriais com ausência ou pequena quantidade de tecido glandular, endométrio apresentando reações histológicas de infecções, hiperplasias ou afecções malignas e ausência de ovulação, após monitorização por ultra-sonografia transvaginal desde a fase folicular e dosagem sérica de progesterona na fase lútea.

A idade das pacientes variou de 26 a 39 anos, com idade média de 30,8 anos, e o diagnóstico e paridade estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Pacientes do Grupo Abortos Recorrentes segundo a idade, a paridade e a etiologia do aborto.

<i>N</i>	<i>Idade</i>	<i>Paciente</i>	<i>Paridade</i>	<i>Etiologia do Aborto</i>
1	28	FRSS	G ₄ P ₀ A ₄	Desconhecida
2	38	AFRS	G ₄ P ₁ A ₃	SAAF
3	34	AHP	G ₆ P ₁ A ₅	Desconhecida
4	29	FA	G ₃ P ₂ *A ₁	Desconhecida
5	29	GASR	G ₃ P ₀ A ₃	SAAF
6	32	MNLD	G ₃ P ₀ A ₃	Desconhecida
7	30	ACGP	G ₄ P ₀ A ₄	Desconhecida
8	33	MSO	G ₆ P ₀ A ₆	Desconhecida
9	39	FAZ	G ₄ P ₃ *A ₁	SAAF
10	34	MRMAF	G ₂ P ₀ A ₂	Desconhecida
11	26	RM	G ₂ P ₁ *A ₄	Desconhecida
12	26	EJSF	G ₂ P ₀ A ₂	SAAF
13	23	KCC	G ₃ P ₀ A ₃	Desconhecida

*óbito fetal antes do feto atingir 500g, G: Gravidezes, P: Partos, A: Abortos, SAAF: Síndrome de Anticorpos Antifosfolípides

As mulheres envolvidas neste estudo foram devidamente esclarecidas sobre os objetivos o trabalho, a forma de coleta do material e seus riscos, e autorizaram por escrito sua participação através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Pós-Informado (Anexo A). O trabalho teve a aprovação da Comissão de Ética Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, processo 7236/07.

3.1.1.2 Grupo Controle

Este grupo foi composto por nove mulheres entre 18 e 40 anos submetidas à biópsia endometrial ou histerectomia durante o mesmo período de estudo do Grupo Aborto no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia (GO) do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), por indicações de doenças benignas, apresentando ciclo menstrual regular, que tenham tido uma ou mais

gestações a termo sem doenças isoladas ou associadas à gestação no mesmo período acima citado.

Os critérios de inclusão do Grupo Controle foram: mulheres com ciclo ovulatório normal, que tivessem tido uma ou mais gestações a termo sem doenças isoladas ou associadas à gestação.

Os critérios de exclusão foram: mulheres que estivessem utilizando hormônios sexuais ou outras medicações, que possuíam alguma patologia endometrial confirmada pelo Serviço de Patologia (SERPAT) do HC da FMRP, USP, portadoras de doenças infecto-contagiosas com possibilidade de transmissão vertical, amostras endometriais com ausência ou pequena quantidade de tecido glandular, endométrio apresentando reações histológicas de infecções, hiperplasias ou afecções malignas e ausência de ovulação, diagnosticada por dosagem de progesterona e avaliação endometrial histológica. Foram selecionadas 9 pacientes no período de estudo, com idade variando entre 28 a 40 anos e idade média de 37,6 anos.

3.1.2 Coleta das biópsias de endométrio

As biópsias endometriais foram obtidas de mulheres com antecedente menstrual normal (intervalo de 26 a 32 dias) e realizadas entre o 5º e 15º dia após a ovulação de ciclos espontâneos. A comprovação da ovulação foi realizada através do exame ultra-sonográfico e da dosagem sérica de progesterona ($\geq 3,0\text{ng/ml}$). Para a uniformização dos dados, o dia da ovulação foi considerado, para fins do estudo, como o 14º dia de um ciclo menstrual de 28 dias.

As biópsias de endométrio foram colhidas, por um ginecologista, através da Pipelle de Cornier (Pipelle de Cornier Endometrial Suction Curette, CooperSurgical, EUA) (Figura 2). Todas as biópsias foram colhidas sem o uso

de anestésicos ou de qualquer agente anestésico local e, uma vez obtidas, foram imediatamente fixadas em solução de formol tamponado 10%. Cuidados foram tomados para que sangue, muco ou ambos não fossem colocados no material a ser fixado.

Todas as amostras foram submetidas à análise histológica clássica com coloração hematoxilina-eosina (HE) e a determinação da fase secretória do ciclo menstrual foi adequada de acordo com o resultado da datação endometrial, segundo os critérios de Noyes et al. (1950), realizada por um patologista, considerado o intervalo de 28 dias como o de um ciclo menstrual ideal.

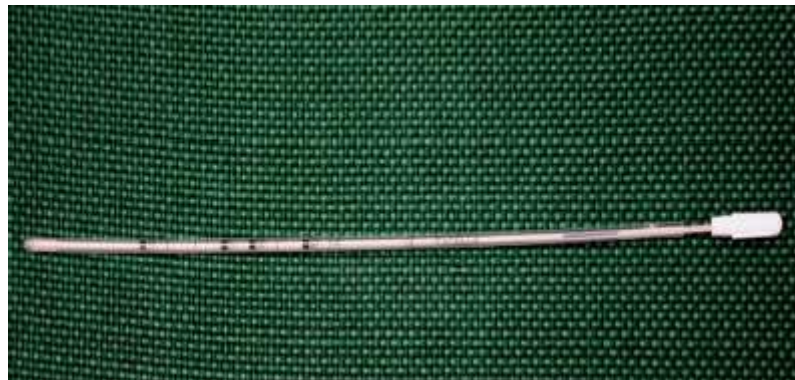


Figura 2: Pipelle de Cornier

As amostras de endométrio obtidas foram classificadas nos seguintes grupos:

1. Fase Proliferativa Inicial: até o 5^o dia do ciclo menstrual;
2. Fase Proliferativa Intermediária: 6^o ao 9^o dia do ciclo menstrual;
3. Fase Proliferativa Final: 10^o dia do ciclo menstrual até o dia ovulatório;
4. Fase Secretória Inicial: 2^o dia pós-ovulatório (PO) até o 5^o dia PO;
5. Fase Secretória Intermediária: 6^o ao 10^o dia PO;
6. Fase Secretória Final: após o 10^o dia PO até o final do ciclo.

3.1.3 Processamento das amostras de endométrio

As amostras colhidas passaram pelo processamento histológico, que inclui fixação em solução tamponada de formol a 10% por no mínimo 24 horas, desidratação com álcoois em diferentes concentrações, diafanização com xilol (Merck, BR) e inclusão em parafina (Histosec, Merck, BR) com ponto de fusão 56° a 58°C.

Os cortes histológicos dos blocos parafinados foram realizados em micrótomo rotativo manual (mod. RN2125RT, Leica, USA), na espessura de 3 a 4 µm. Estes cortes foram colocados em lâminas previamente tratadas com 3-aminopropyl-triethoxysilan (silano – Sigma, EUA), deixados por 30 minutos em estufa a 60°C e estocados à temperatura ambiente até dia do processamento pela técnica de imunohistoquímica (IHC). Todas as amostras de endométrio obtidas foram coradas por HE, para avaliação anátomo-patológica de um patologista.

3.1.4 Imunohistoquímica (IHC)

As reações de IHC foram realizadas no Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

No dia do processamento, os cortes histológicos parafinados passaram por um processo de desidratação com álcoois em diferentes concentrações, diafanização com xilol (Merck, BR). Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica com calor úmido, em banho-maria histológico à temperatura de 96° a 98°C por 40 minutos (SHI et al., 1997). A recuperação antigênica foi padronizada, buscando-se o melhor tampão a ser utilizado, que neste caso foi o tampão tris-EDTA (*Tris(hydroxymethyl)aminomethane-Ethylenediamine Tetraacetic Acid*) (Merck, BR) pH 9 com 0,05% de Tween 20 (Across Organics, EUA). Ao término do procedimento para a recuperação antigênica, os cortes

foram hidratados com solução salina tamponada por fosfatos (PBS pH 7,4) e tratados com solução composta por 50% metanol (Merck, BR), 50% PBS por 10 minutos, para inativação da peroxidase endógena. Em seguida, estes cortes foram incubados por 18 horas em câmara úmida à temperatura ambiente, com os anticorpos monoclonais diluídos em PBS pH 7,4 com 1% soro albumina bovina (BSA9647) (Sigma, EUA) e 0,05%, Tween 20. O anticorpo monoclonal anti-neoantígeno de C9 utilizado foi o clone WU-7,2 gentilmente cedido pelo Prof. Reinhart Würzner (Innsbruck – Áustria), na diluição 1:1000. O anticorpo monoclonal anti-DAF (cód. MCA1614 - Serotec, UK) utilizado foi do isotipo IgG1, clone 67 purificado, na diluição 1:25. O anticorpo monoclonal anti-CD59 (cód. MCA1054 - Serotec, UK) utilizado foi do isotipo IgG2a, clone MEM-43 purificado, na diluição 1:50. Em seguida, o tecido foi lavado com PBS pH 7.4 com 0,05% Tween 20 e incubado com o anticorpo secundário anti-camundongo isotipo IgG (H+L), feito em cavalo (cód. BA-2000 - Vector Laboratories, UK), na diluição 1:200 por 1 hora em temperatura ambiente. Após esta incubação, o tecido foi lavado com PBS pH 7.4 com 0,05% Tween 20 e incubado com o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) (Novocastra, UK) por 50 minutos em temperatura ambiente. A revelação foi realizada com o cromógeno 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Sigma, EUA), misturado com 0,95% peróxido de hidrogênio (H₂O₂), 30 volumes (Tec-Lab, BR) por 10 minutos à temperatura ambiente.

A reação foi interrompida lavando o tecido com água destilada. A contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris. Em seguida, o tecido passou pelo processo de desidratação com álcoois em diferentes concentrações e diafanização com xilol. Para finalmente a montagem da lamínula, que foi

realizada em meio não aquoso com solução tolueno denominada Permout (Fisher Scientific, EUA).

Como controle positivo da reação para o neoantígeno de C9, utilizamos a área isquêmica de infarto do miocárdio humano. O controle negativo da reação foi feito substituindo o anticorpo primário pelo PBS pH 7,4 com 1% soro albumina bovina (BSA9647) e 0,05%, Tween 20 nos mesmos tecidos do controle positivo.

Como controle positivo da reação para DAF e CD59, utilizamos a placenta de gestação a termo, normal. O controle negativo da reação foi feito substituindo o anticorpo primário pelo PBS pH 7,4 com 1% soro albumina bovina (BSA9647) e 0,05%, Tween 20, nos mesmos tecidos do controle positivo.

A leitura das lâminas foi feita por três examinadores de forma aleatória e “cega” em microscopia óptica comum.

A reação positiva foi semi-quantificada em cruzes variando de 0 a +++ à medida que se obteve maior marcação (coloração) de acordo com os critérios descritos na Tabela 2:

Tabela 2: Padrão de marcação de imunohistoquímica nas células glandulares endometrial

Score	Expressão Protéica	Padrão de Imunoexpressão
0	Negativa	Ausência de coloração nas células glandulares
0/+	Positiva fraca	Reação de fraca intensidade e focal
+	Positiva fraca	Reação de fraca intensidade e difusa
++	Positiva forte	Reação de moderada intensidade e difusa
+++	Positiva forte	Reação de forte intensidade e focal

3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O resultado proveniente da leitura das lâminas marcadas por imunohistoquímica foi tabulado juntamente com as informações sobre a fase do ciclo na qual a paciente se encontrava no momento da realização da biópsia endometrial.

A análise estatística dos resultados das marcações para o neoantígeno de C9, DAF e CD59 nas fases do ciclo menstrual das pacientes do Grupo Controle e do Grupo Aborto foi feita através do Teste Exato de Fischer utilizando o procedimento *PROC FREQ* do software *SAS*[®] 9.0. Para facilitar os cálculos estatísticos, os dados semi-quantitativos da imunohistoquímica foram agrupados em três grupos: reações negativas (0) como marcação negativa, reações fracas (0/+ e +) foram analisadas em um mesmo grupo como marcação fraca e reações moderadas e fortes (++ e +++) foram analisadas em um mesmo grupo como marcação forte. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA MAC (C5b-9) NO ENDOMÉTRIO DO GRUPO CONTROLE E DO GRUPO ABORTO

A expressão do neoantígeno de C9 foi ausente no tecido endometrial tanto para as glândulas endometriais quanto para o estroma nas mulheres com Aborto de Repetição e nas férteis (Figura 5 e 6). Houve expressão do neoantígeno de C9 no endotélio vascular para ambos os grupos. Os controles negativo e positivo das reações foram miocárdio, onde as áreas de infarto apresentaram coloração (Figura 3 e 4). Os resultados da intensidade da reação imunohistoquímica com o anticorpo anti-TCC (C5b-9) podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados semi-quantitativos para o anticorpo anti-TCC (C5b-9) no tecido endometrial de mulheres com Aborto de Repetição (Aborto) e das férteis normais (Controle)

<i>GRUPO ABORTO</i>			<i>GRUPO CONTROLE</i>		
N	Fase do Ciclo	Intensidade	N	Fase do Ciclo	Intensidade
	Menstrual			Menstrual	
1	Secretor Inicial	Negativa	1	Secretor Intermediário	Negativa
2	Secretor Inicial	Negativa	2	Secretor Intermediário	Negativa
3	Secretor Inicial	Negativa	3	Secretor Intermediário	Negativa
4	Secretor Intermediário	Negativa	4	Secretor Intermediário	Negativa
5	Secretor Intermediário	Negativa	5	Secretor Intermediário	Negativa
6	Secretor Intermediário	Negativa	6	Secretor Intermediário	Negativa
7	Secretor Intermediário	Negativa	7	Secretor Tardio	Negativa
8	Secretor Intermediário	Negativa	8	Secretor Tardio	Negativa
9	Secretor Intermediário	Negativa	9	Secretor Tardio	Negativa
10	Secretor Tardio	Negativa			
11	Secretor Tardio	Negativa			
12	Secretor Tardio	Negativa			
13	Secretor Tardio	Negativa			

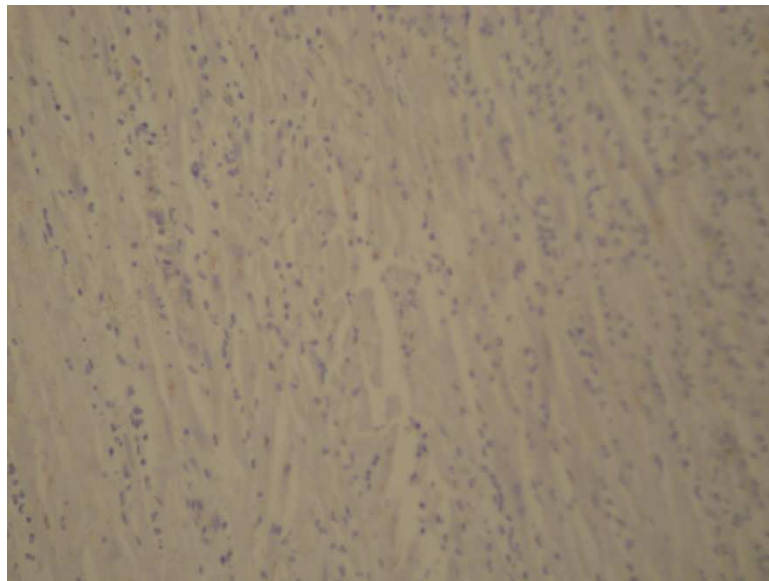


Figura 3: Reação de Imunohistoquímica no miocárdio humano normal utilizando o anticorpo anti-TCC (C5b-9). Detecção pelo método Avidina-Biotina-Peroxidase. Reação revelada com DAB. Controle negativo da reação utilizando área isquêmica de infarto de miocárdio (200X).

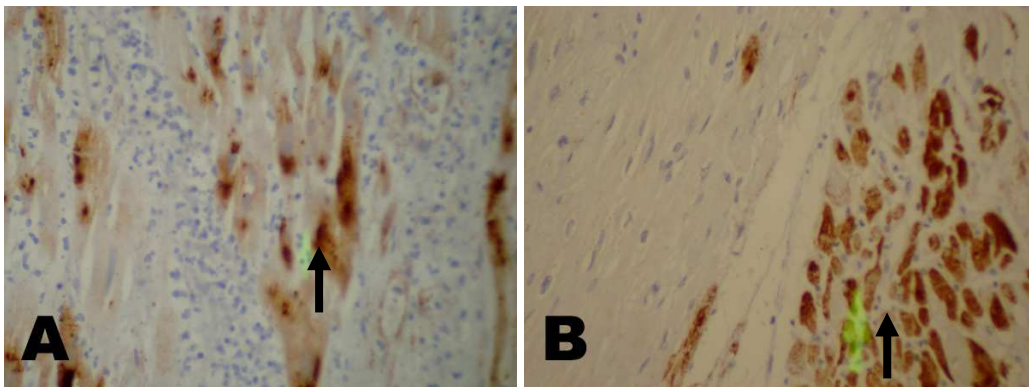


Figura 4: Reação de Imunohistoquímica no miocárdio humano normal utilizando o anticorpo anti-TCC (C5b-9). Detecção pelo método Avidina-Biotina-Peroxidase. Reação revelada com DAB. A. Controle positivo da reação utilizando área isquêmica de infarto de miocárdio, com destaque para marcação positiva das fibras cardíacas em sofrimento (seta) e negativa no infiltrado inflamatório (200X). B. Controle positivo da reação utilizando área isquêmica de infarto de miocárdio, à esquerda músculo cardíaco preservado e à direita, músculo cardíaco em sofrimento (seta) (200X).

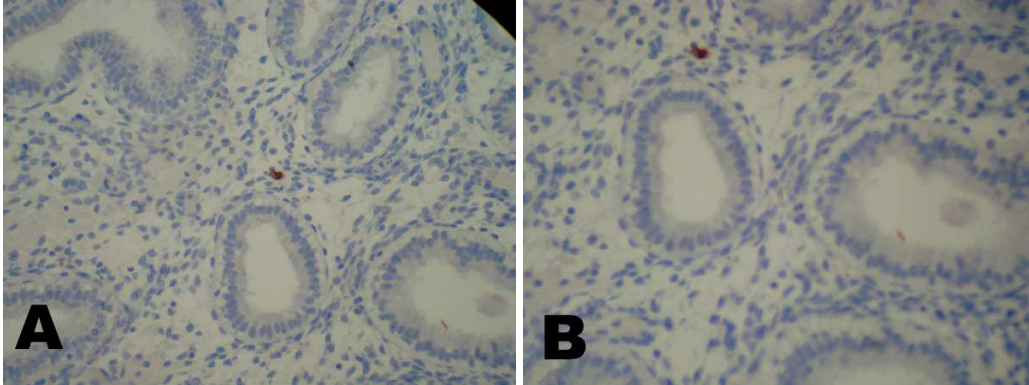


Figura 5: Reação de Imunohistoquímica das glândulas do tecido endometrial humano normal utilizando o anticorpo anti-TCC (C5b-9). Detecção pelo método Avidina-Biotina-Peroxidase. Reação revelada com DAB. A. Reação Negativa na fase secretória do ciclo menstrual de mulheres com aborto de repetição (200X). B. Reação Negativa na fase secretória do ciclo menstrual de mulheres com aborto de repetição (200X).

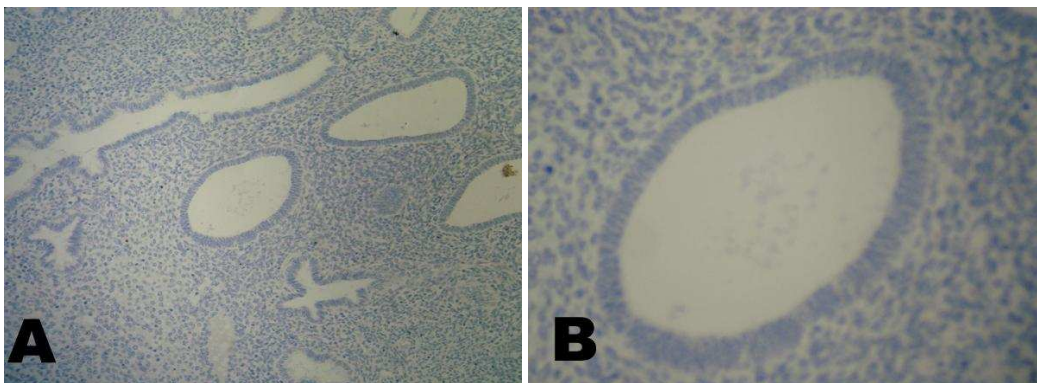


Figura 6: Reação de Imunohistoquímica das glândulas do tecido endometrial humano normal utilizando o anticorpo anti-TCC (C5b-9). Detecção pelo método Avidina-Biotina-Peroxidase. Reação revelada com DAB. A. Reação Negativa na fase secretória do ciclo menstrual de mulheres férteis normais (200X). B. Reação Negativa na fase secretória do ciclo menstrual de mulheres férteis normais (400X).

4.2 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DAF NO ENDOMÉTRIO DO GRUPO ABORTO

Houve imunomarcção para DAF, com predomínio de marcação nas glândulas endometriais em ambos os grupos, AER e Controle. A imunoreatividade presente foi observada na membrana e no citoplasma total das células glandulares endometriais, no estroma e no endotélio vascular.

Observou-se nítida tendência ao aumento da expressão de DAF no Grupo AER (Figura 9A) durante a fase secretória intermediária, comparado ao grupo controle (Figura 9B), entretanto esta tendência não foi detectada estatisticamente ($p=0,71$). Os controles negativo e positivo das reações foram tecido placentário a termo normal (Figura 7 e 8). Os resultados da intensidade da imunomarcção com o anticorpo anti-DAF (CD55) podem ser vistos na tabela abaixo.

Tabela 4: Resultados semi-quantitativos para o anticorpo anti-DAF (CD55) no tecido endometrial de mulheres com Aborto de Repetição (Aborto) e das férteis normais (Controle).

GRUPO ABORTO			GRUPO CONTROLE		
N	Fase do Ciclo	Intensidade	N	Fase do Ciclo	Intensidade
	Menstrual			Menstrual	
1	Secretor Inicial	Fraca	1	Secretor Inicial	Fraca
2	Secretor Inicial	Forte	2	Secretor Inicial	Negativa
3	Secretor Inicial	Fraca	3	Secretor Intermediário	Fraca
4	Secretor Intermediário	Forte	4	Secretor Intermediário	Fraca
5	Secretor Intermediário	Fraca	5	Secretor Intermediário	Negativa
6	Secretor Intermediário	Forte	6	Secretor Intermediário	Forte
7	Secretor Intermediário	Forte	7	Secretor Tardio	Forte
8	Secretor Intermediário	Fraca	8	Secretor Tardio	Fraca
9	Secretor Intermediário	Fraca	9	Secretor Tardio	Fraca
10	Secretor Tardio	Fraca			
11	Secretor Tardio	Forte			
12	Secretor Tardio	Fraca			
13	Secretor Tardio	Fraca			

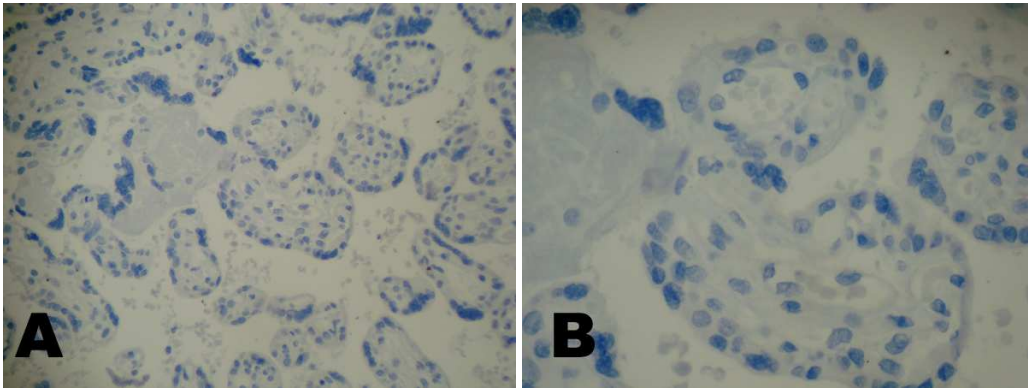


Figura 7: Reação de Imunohistoquímica na placenta humana normal utilizando o anticorpo anti-DAF (CD55). Detecção pelo método Avidina-Biotina-Peroxidase. Reação revelada com DAB. A. Controle negativo da reação utilizando o tecido placentário a termo normal (200X). B. Controle negativo da reação utilizando o tecido placentário a termo normal (400X).

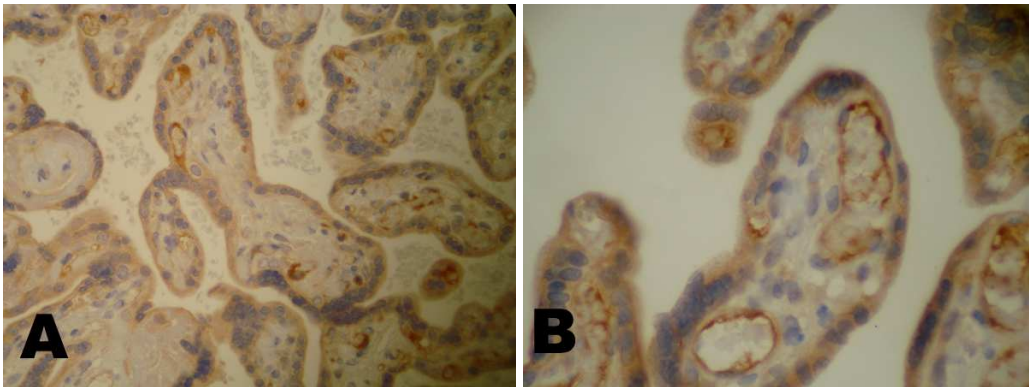


Figura 8: Reação de Imunohistoquímica na placenta humana normal utilizando o anticorpo anti-DAF (CD55). Detecção pelo método Avidina-Biotina-Peroxidase. Reação revelada com DAB. A. Controle positivo da reação utilizando o tecido placentário a termo normal (200X). B. Controle positivo da reação utilizando o tecido placentário a termo normal (400X).

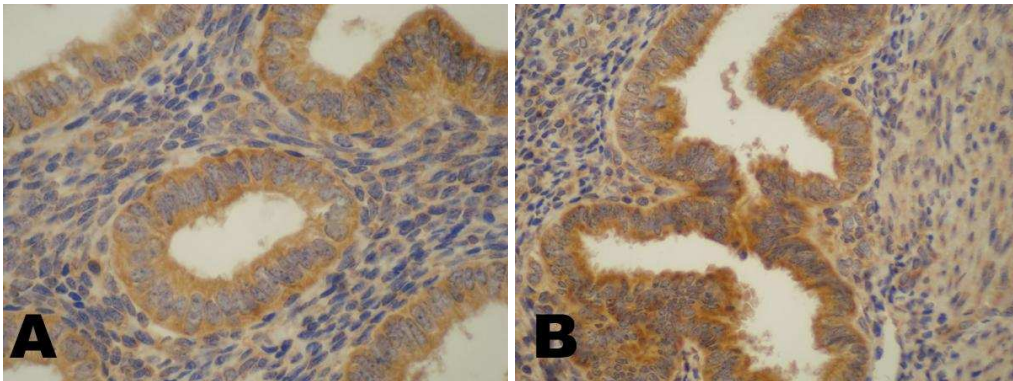


Figura 9: Reação de Imunohistoquímica das glândulas do tecido endometrial humano normal utilizando o anticorpo anti-DAF (CD55). Detecção pelo método Avidina-Biotina-Peroxidase. Reação revelada com DAB. A. Reação Positiva na fase secretória do ciclo menstrual de mulheres com aborto de repetição (400X). B. Reação Positiva na fase secretória do ciclo menstrual de mulheres férteis normais (400X).

A frequência de expressão para DAF está ilustrada na Figura 10.

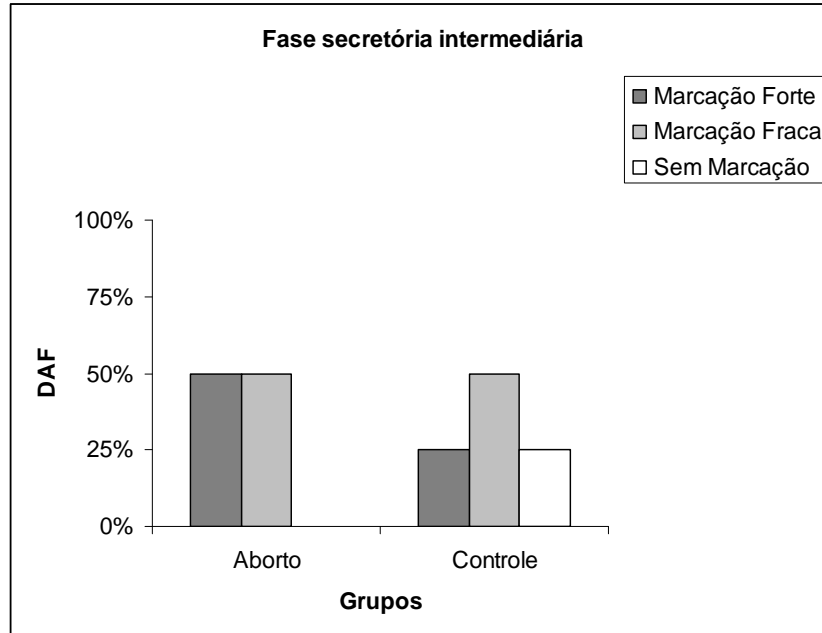


Figura 10: Histograma da frequência de expressão de DAF (CD55) na fase secretória do ciclo menstrual de mulheres férteis normais (Controle) e das com Aborto de Repetição (Aborto).

4.3 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA CD59 NO ENDOMÉTRIO DO GRUPO ABORTO

Na figura 13 observa-se uma fotomicrografia representativa da reação imunohistoquímica para CD59. Em relação à expressão de CD59 observou-se, nítida tendência ao aumento na sub-fase secretória intermediária do ciclo menstrual do Grupo Aborto quando comparado com o Controle, embora de maneira não estatisticamente significativa ($p=0,20$) (Figura 14). A imunomarcagem para CD59 foi observada, predominantemente, nas glândulas endometriais em ambos os grupos (Figura 13). A imunoreatividade estava presente na membrana e no citoplasma, sendo mais marcante na superfície apical, das células glandulares endometriais, no estroma e no endotélio vascular.

Os controles negativo e positivo das reações foram tecido placentário a termo normal (Figura 11 e 12).

Os resultados da intensidade da imunomarcagem com o anticorpo anti-CD59 podem ser vistos na tabela abaixo (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados semi-quantitativos para o anticorpo anti-CD59 no tecido endometrial de pacientes com Aborto de Repetição (Aborto) e das normais (Controle).

GRUPO ABORTO			GRUPO CONTROLE		
N	Fase do Ciclo	Intensidade	N	Fase do Ciclo	Intensidade
	Menstrual			Menstrual	
1	Secretor Inicial	Forte	1	Secretor Inicial	Forte
2	Secretor Inicial	Fraca	2	Secretor Inicial	Forte
3	Secretor Inicial	Forte	3	Secretor Intermediário	Fraca
4	Secretor Intermediário	Fraca	4	Secretor Intermediário	Fraca
5	Secretor Intermediário	Fraca	5	Secretor Intermediário	Fraca
6	Secretor Intermediário	Forte	6	Secretor Intermediário	Fraca
7	Secretor Intermediário	Forte	7	Secretor Tardio	Fraca
8	Secretor Intermediário	Forte	8	Secretor Tardio	Fraca
9	Secretor Intermediário	Fraca	9	Secretor Tardio	Fraca
10	Secretor Tardio	Fraca			
11	Secretor Tardio	Fraca			
12	Secretor Tardio	Fraca			
13	Secretor Tardio	Fraca			

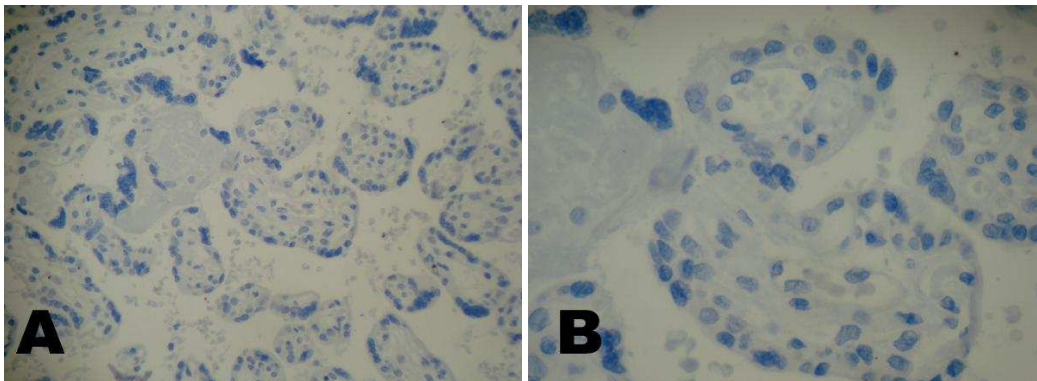


Figura 11: Reação de Imunohistoquímica na placenta humana normal utilizando o anticorpo anti-CD59. Detecção pelo método Avidina-Biotina-Peroxidase. Reação revelada com DAB. A. Controle negativo da reação utilizando o tecido placentário a termo normal (200X). B. Controle negativo da reação utilizando o tecido placentário a termo normal (400X).

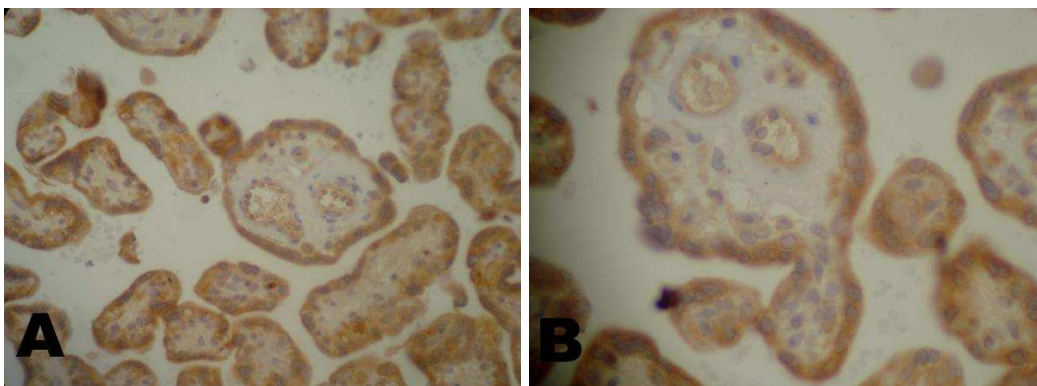


Figura 12: Reação de Imunohistoquímica na placenta humana normal utilizando o anticorpo anti-CD59. Detecção pelo método Avidina-Biotina-Peroxidase. Reação revelada com DAB. A Controle positivo da reação utilizando o tecido placentário a termo normal (200X). B. Controle positivo da reação utilizando o tecido placentário a termo normal (400X).

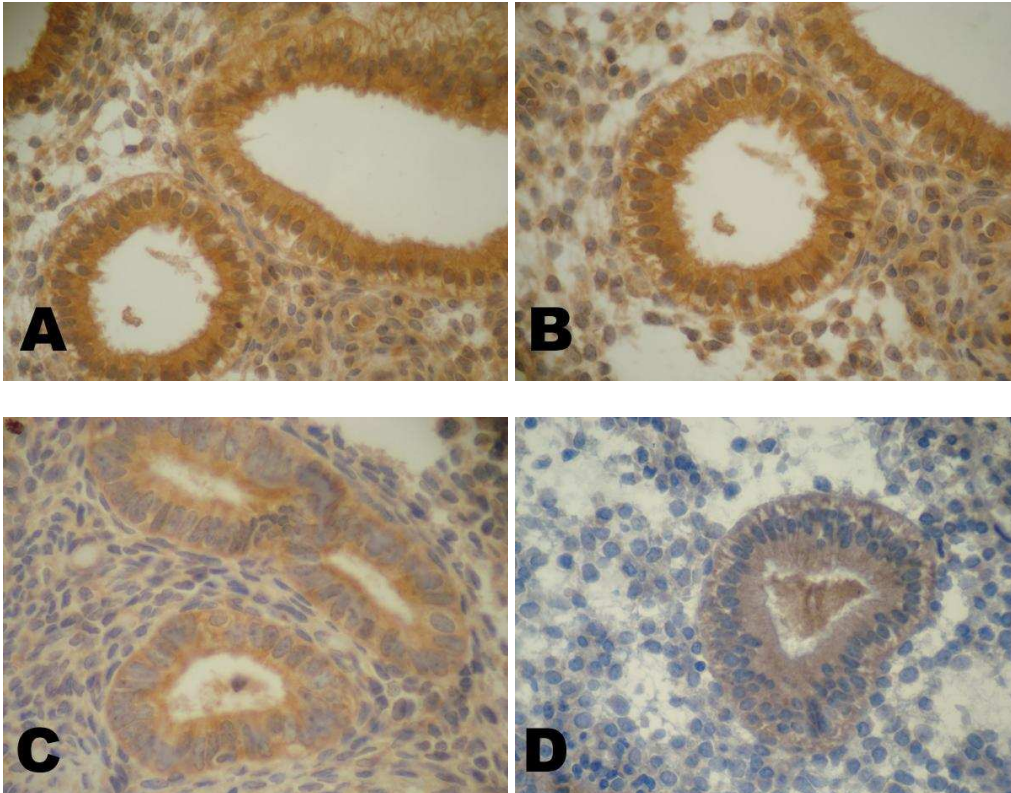


Figura 13: Reação de Imunohistoquímica das glândulas do tecido endometrial humano normal utilizando o anticorpo anti-CD59. Detecção pelo método Avidina-Biotina-Peroxidase. Reação revelada com DAB. A e B. Reação Positiva na fase secretória do ciclo menstrual de mulheres com aborto de repetição (400X). C e D. Reação Positiva na fase secretória do ciclo menstrual de mulheres férteis normais (400X).

A frequência de expressão para CD59 está ilustrada na Figura 14.

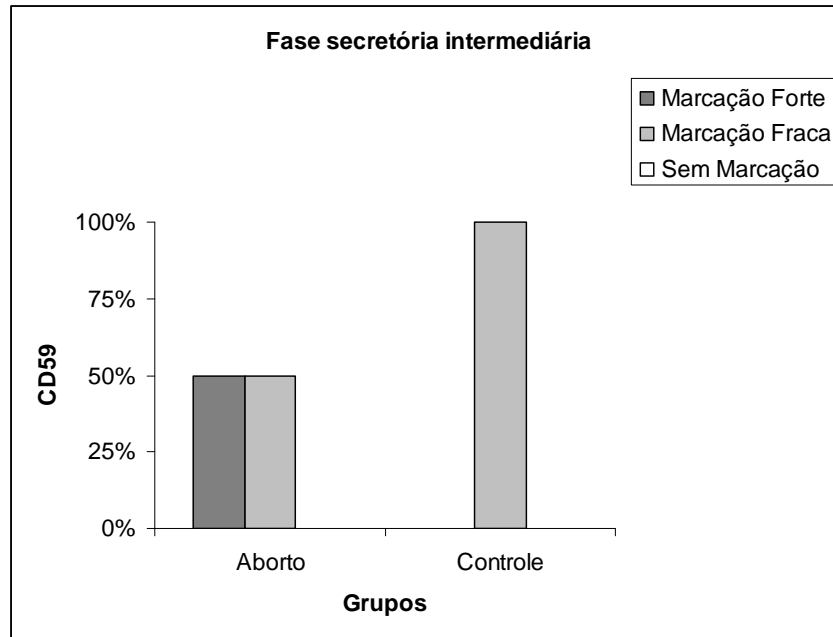


Figura 14: Histograma da frequência de expressão de CD59 na fase secretória do ciclo menstrual em mulheres férteis normais (Controle) e das com Aborto de Repetição (Aborto)

5 DISCUSSÃO

Peter Medawar em 1953 foi o primeiro a reconhecer que a gestação envolve processos imunológicos. Dentre eles, a adequada interação entre o Sistema Reprodutor e o SC permite o sucesso reprodutivo. A presença de componentes do SC e de sua regulação por todo o trato reprodutivo masculino e feminino, tanto nas células quanto nos fluidos, é parte fundamental deste processo e está documentada na literatura através de vários autores (ROONEY et al., 1992; VANDERPUYE et al., 1992; BOZAS et al., 1993; HASTY et al., 1994; FENICHEL et al., 1995; JENSEN et al., 1995; TAYLOR & JOHNSON, 1996; JIANG & PILLAI, 1998; IBORRA et al., 2003). No entanto, existem poucos trabalhos que avaliam a expressão destes componentes no endométrio durante o ciclo menstrual e sob condições patológicas como o Aborto Espontâneo de Repetição (AER). Os estudos encontrados na literatura até o momento se referem à interface materno-fetal e não ao endométrio sem gestação destas pacientes.

Assim na presente pesquisa, procurou-se verificar a expressão do MAC, e das proteínas reguladoras do SC, DAF e CD59, nas glândulas e no estroma do endométrio de mulheres ovulatórias e férteis e, de mulheres ovulatórias com aborto de repetição durante a fase secretória do ciclo menstrual. Algumas destas proteínas inibidoras do SC, como DAF (YOUNG et al., 2002, NOGAWA FONZAR-MARANA et al., 2006) e CD59 (NOGAWA FONZAR-MARANA et al., 2006), já tiveram sua expressão identificada e confirmada no endométrio e suas freqüências ao longo do ciclo menstrual também já foram determinadas por meio de estudos imunohistoquímicos. Porém, estes estudos só avaliaram a expressão destas proteínas em mulheres ovulatórias e férteis, e não em

condições patológicas, como pacientes ovulatórias e com abortos de repetição espontâneos.

Em nosso estudo, não detectamos o neoantígeno de C9 nas glândulas endometriais de mulheres férteis e nem nas de mulheres com aborto de repetição durante a fase secretória do ciclo menstrual. Estes nossos achados diferem do único estudo encontrado na literatura que avalia a expressão do MAC no tecido endometrial realizado por RATNOFF et al. (1995). Para RATNOFF et al. (1995) o neoantígeno de C9 estava expresso nas glândulas endometriais normais por todo o ciclo menstrual. Esta discordância pode ser devida ao fato de que o trabalho realizado por estes autores utilizou o anticorpo monoclonal murino anti-humano SC5b-9 e em nosso estudo utilizamos o anticorpo monoclonal murino anti-humano C5b-9(m). A diferença destes dois tipos de MAC, C5b-9(m) e SC5b-9, consiste no fato de que um ocorre na superfície das membranas plasmáticas e outro no plasma sanguíneo. A ativação do SC na membrana plasmática resulta na geração do C5b-9(m), um complexo lítico, enquanto a ativação do SC em fase fluída gera o SC5b-9, um complexo não lítico e solúvel em água. Ambas as formas de MAC possuem o neoantígeno de C9 e podem ser determinadas imunohistoquimicamente, entretanto o anticorpo SC5b-9 pode detectar também a proteína S ou vitronectina complexada na forma de SC5b-9 (MOLLNES & HARBOE, 1987), o que poderia ter resultado nos achados positivos, para glândulas endometriais, encontrados por RATNOFF et al. (1995). A vantagem de se utilizar o anticorpo monoclonal para C9 direcionado para o neoantígeno (C5b-9) presente no MAC e não para a molécula nativa de C9, é a detecção do MAC e não somente do componente C9 nos endométrios analisados, o que confirma que houve uma ativação efetiva do SC até seus componentes terminais.

Além disto, RATNOFF et al. (1995) analisaram uma pequena casuística, seis mulheres com história clínica de infertilidade sem causa aparente, menorragia ou dor pélvica crônica, sendo duas na fase proliferativa e quatro na fase secretória, quando comparada à nossa, de nove mulheres comprovadamente férteis e ovulatórias e treze mulheres com histórico de infertilidade secundária por aborto de repetição durante a fase secretória do ciclo menstrual. Em adição, estes autores não excluíram os endométrios de pacientes com algum tipo de disfunção ou de doença concomitante. Neste caso, nosso estudo parece-nos mais cuidadoso, uma vez que excluímos estas pacientes de nossa casuística, avaliando somente os casos de aborto de repetição por Síndrome de Anticorpos Antifosfolípides (SAAF) e por causas não explicadas. Este rigor na obtenção dos espécimes nos permitiu a análise dos dados sem a interferência de outros fatores.

Já em relação ao estroma endometrial, não observamos marcação no tecido endometrial de mulheres férteis normais e nem no de mulheres com aborto de repetição durante a fase secretória do ciclo menstrual, o que concorda com os achados descritos por RATNOFF et al. (1995), que também não detectou marcação para o neoantígeno de C9 no estroma endometrial. Adicionalmente, encontramos expressão para o neoantígeno de C9 no endotélio vascular, sem variação desta expressão com o decorrer do ciclo.

Os poucos estudos existentes na literatura que avaliam a presença e distribuição do neoantígeno de C9, o fazem nas vilosidades coriônicas placentárias (TEDESCO et al., 1990; RAMPERSAD et al., 2008) e eles revelam que há deposição de MAC nas placentas normais, entretanto esta deposição está extremamente aumentada em situações patológicas como na pré-eclâmpsia e no retardo do crescimento intra-uterino.

Em relação ao CD59, nosso trabalho detectou-o nas glândulas endometriais durante a fase secretória do ciclo menstrual do Grupo Aborto e do Grupo Controle, com expressão claramente acentuada na sub-fase intermediária do Grupo Aborto. Apesar deste resultado, devido à baixa casuística de nosso trabalho, não detectamos diferença estatística entre estes dois grupos.

Como, neste estudo avaliamos somente biópsias endometriais que estavam na fase secretória do ciclo menstrual, não pudemos afirmar se estes resultados concordavam ou discordavam dos descritos por RATNOFF et al. (1995) e JENSEN et al. (1995), que demonstraram que CD59 AER expresso nas glândulas endometriais por todo ciclo menstrual sem variação entre as fases proliferativa e secretória. Contudo, estes autores não se referiram à expressão hormônio-dependente de CD59. A frequência de expressão para CD59, em ambos os grupos, foi de membrana e de citoplasma com predomínio na porção apical. Esta forma de posicionamento nas membranas apicais pode resultar de uma diferenciação celular como sugerem JOHNSTONE et al. (1993) ou pela polarização do glicosilfosfatidilinositol (GPI) que se liga às moléculas da superfície apical das células como sugerem LISANTI et al. (1990). Estes resultados concordam com os encontrados por NOGAWA FONZAR-MARANA et al. (2006), que detectou CD59 predominantemente na porção apical das células glandulares durante a fase secretória do ciclo menstrual de mulheres ovulatórias e férteis.

Em nosso grupo de estudo mantivemos o cuidado de selecionar para biópsia endometrial somente as mulheres com causas de aborto de repetição não explicadas ou por Síndrome de Anticorpos Antifosfolípides (SAAF). Estas mulheres tiveram esgotadas as investigações para infertilidade. Todas tiveram

o ciclo menstrual monitorado por exame ultrassonográfico. Este rigor na obtenção dos espécimes nos permitiu a análise dos dados sem interferência de outros fatores, visto que frente a determinadas doenças como deficiência de fase lútea (KAUL et al., 1995) e endometriose (McLAUGHLIN et al., 1996), podem ocorrer alterações na presença de alguns componentes do SC, bem como de suas proteínas reguladoras que poderiam interferir na interpretação dos resultados.

Avaliando o estroma endometrial, encontramos marcação para o CD59 em células mononucleares e células musculares do miométrio tanto do Grupo Controle quanto do Grupo Aborto. Estes resultados concordam com os descritos por JENSEN et al. (1995) que obtiveram marcação para CD59 em fibras musculares e também em algumas células mononucleares no estroma e tecido muscular de mulheres ovulatórias normais e diferem dos encontrados por RATNOFF et al. (1995) e NOGAWA FONZAR-MARANA et al. (2006), que não encontraram marcação no estroma endometrial destas mulheres.

Quando observamos os endotélios vasculares do endométrio, encontramos uma forte marcação para CD59, sem variação de expressão no decorrer da fase lútea do ciclo menstrual, no Grupo Controle e no Grupo Aborto, resultado que coincide com os achados encontrados por JENSEN et al. (1995) e NOGAWA FONZAR-MARANA et al. (2006) em mulheres férteis e sem doenças associadas à fertilidade. A presença de CD59 no endotélio é de grande importância na proteção das células endoteliais contra a lise mediada pelo SC e a deposição de componentes do complemento no endotélio, visto que este está continuamente exposto às ativações do SC, principalmente durante as inflamações (BROOIMANS et al., 1992).

Outra discordância entre nossos resultados e os de RATNOFF et al. (1995) e de JENSEN et al. (1995) é que, apesar de estes autores utilizarem o mesmo anticorpo monoclonal (MEM-43) utilizado em nosso trabalho, a forma de apresentação dos resultados difere da forma que utilizamos. RATNOFF et al. (1995) e JENSEN et al. (1995) descreveram seus resultados de forma qualitativa, indicando a presença ou a ausência das proteínas em estudo, mas não as variações de suas intensidades de expressão. Os nossos dados foram analisados por três examinadores de modo aleatório e “cego”, que classificou o resultado segundo a intensidade da reação, utilizando um método semi-quantitativo. Este método de análise permite uma avaliação mais abrangente da variação destas proteínas durante a fase secretória do ciclo menstrual (NOGAWA FONZAR-MARANA et al., 2006).

CD59 está presente na membrana plasmática externa do espermatozóide (ROONEY, OGLESBY & ATKINSON, 1993; SIMPSON & HOLMES, 1994; FENICHEL et al., 1994), no epitélio endometrial (JENSEN et al., 1994; NOGAWA FONZAR-MARANA et al., 2006) e na placenta (HOLMES et al., 1992; TEDESCO et al., 1993; VANDERPUYE, LABARRERE & McINTYRE, 1993). Deste modo, a presença da proteína reguladora do SC, CD59, no trato reprodutivo tanto feminino quanto masculino indica a necessidade de um controle da ativação deste sistema a fim de preservar certas funções reprodutivas, como a fertilização, a implantação e o desenvolvimento embrionário sugerindo assim, um papel essencial desta CRP na manutenção da fertilidade.

Baseado no fato de que 25% das pacientes com AER possuíam deposição do componente C9 nos vasos da placenta (GIRARDI et al., 2006a), indicando uma provável ativação do SC nesta patologia, acreditamos que a

deposição de C9 na placenta poderia elevar a expressão de CD59, nestas pacientes, como um mecanismo compensatório de controle do SC. E esta elevação permaneceria no endométrio destas mulheres mesmo após a perda gestacional. Deste modo, este aumento apresentado na fase secretória intermediária do ciclo menstrual permitiria a implantação, porém não corretamente, o que estaria resultando na posterior perda gestacional.

Além do mais, a ausência de expressão do neoantígeno de C9 no endométrio destas pacientes com AER, concorda com a hipótese de que o aumento de CD59 impede que a ativação do SC chegue até o seu ponto final.

Analisando a expressão de DAF, confirmamos a marcação na fase secretória do ciclo menstrual do Grupo Aborto e do Grupo Controle, além disto, encontramos expressão acentuada durante a fase secretória intermediária do ciclo menstrual no Grupo Aborto. Embora tenha sido observado este nítido aumento na sub-fase secretória intermediária, a diferença estatística não alcançou significância. Provavelmente, devida à baixa casuística de nosso estudo.

Esta expressão foi caracterizada pela marcação de membrana e de padrão citoplasmático com predomínio total, tanto no Grupo Controle quanto no Grupo Aborto, diferentemente do encontrado por D'CRUZ et al. (1992), por HASTY et al. (1994) e por NOGAWA FONZAR-MARANA et al. (2006) que observaram marcação predominante na superfície apical das células glandulares endometriais. Esta diferença é possivelmente devida à diferença metodológica entre nosso estudo, onde utilizamos o anticorpo monoclonal anti-DAF (clone 67) e espécimes incluídos em parafina, enquanto os autores acima citados, como HASTY et al. (1994) e NOGAWA FONZAR-MARANA et al.

(2006), utilizaram o anticorpo monoclonal anti-DAF (clone IA-10) e amostras provenientes de cortes de congelação.

Como, neste estudo avaliamos somente biópsias endometriais que estavam na fase secretória do ciclo menstrual, não podemos afirmar se estes resultados concordavam ou discordavam dos descritos por JENSEN et al. (1995), que demonstraram que DAF era expresso nas glândulas endometriais por todo ciclo menstrual sem variação entre as fases proliferativa e secretória.

Em nosso trabalho a expressão de DAF no estroma do endométrio humano dos Grupos Controle e Aborto foi fraca em algumas sub-fases da fase secretória do ciclo menstrual, mas na maioria dos casos foi detectada, concordando com os achados descritos por JENSEN et al. (1995), que encontraram marcação para esta proteína em fibras musculares e em algumas células mononucleares do estroma endometrial e do tecido muscular de mulheres ovulatórias e férteis, e discordando do que foi descrito por HASTY et al. (1994) e por NOGAWA FONZAR-MARANA et al. (2006), que não encontraram marcação para DAF no estroma destas pacientes.

Quando observamos os endotélios vasculares do endométrio, encontramos uma fraca marcação para DAF no Grupo Controle e no Grupo Aborto, sem variação de expressão no decorrer da fase lútea do ciclo menstrual, resultado que coincide com os achados de HASTY et al. (1994) e de NOGAWA FONZAR-MARANA et al. (2006) e discorda dos descritos por BROOIMANS et al. (1992) e JENSEN et al. (1995) que além de detectarem fortemente esta proteína no endotélio vascular, sugeriram que a mesma estivesse funcionalmente ativa.

Os mecanismos que determinam o aumento das proteínas reguladoras do SC em determinadas fases do ciclo menstrual ainda não estão bem

esclarecidos. KAUL et al. (1996) e YOUNG et al. (2002) confirmaram, através da análise do mRNA de DAF, que o aumento desta proteína durante a janela de implantação, deve-se ao aumento da síntese de DAF durante este período, provavelmente estimulada pela produção de progesterona. Estes achados contradizem a hipótese proposta por vários autores (PARKER, 1992; ROONEY et al., 1993a; ROONEY et al., 1993b) que acreditavam que as formas solúveis de DAF tinham capacidade de se transferirem para as membranas celulares via âncora de GPI, aumentando assim, sua expressão na membrana plasmática ou que o aumento da expressão de DAF na membrana das células glandulares endometriais seria pela adsorção passiva destas proteínas a partir do plasma sanguíneo para as membranas (RATNOFF et al., 1995). Entretanto, acreditamos que o mecanismo mais provável do aumento de DAF durante o período de implantação seria secundário ao aumento da expressão de C3 no endométrio (HASTY et al., 1994) durante a fase secretória do ciclo menstrual. Este fenômeno, estimulado pela progesterona, já foi demonstrado e confirmado através da análise de mRNA nas células das glândulas endometriais (SAYEGH et al., 1996).

Recentemente YOUNG et al. (2002) sugeriram que a expressão de DAF na fase secretória intermediária é estimulada diretamente pelo HB-EGF, ou por outros membros da família EGF que estão expressos no útero durante o período de implantação. Deste modo, é lícito supor que mulheres com AER apresentam um aumento dos membros da família EGF que poderia aumentar a expressão de DAF durante o período de implantação e prejudicar o desenvolvimento normal da placenta.

Estudos animais onde a deficiência de Crpy, uma proteína de membrana reguladora do SC expressa no trofoblasto dos camundongos, que age

regulando a C3 convertase (XU et al., 2000), fez com que acreditássemos que uma possível diminuição ou até mesmo a ausência da expressão de DAF durante o período de implantação poderia ser a causa de abortos espontâneos recorrentes nestas pacientes. Entretanto, o resultado que encontramos foi o oposto do esperado, ou seja, a expressão de DAF estava aumentada, embora não detectada estatisticamente, durante a sub-fase secretória intermediária no grupo de AER.

Partindo do princípio que pacientes com AER possuem deposição de C3d nos vasos da placenta (GIRARDI et al., 2006a) e redução da concentração sérica de C3 (CUNNINGHAM & TICHENOR, 1995; TICHENOR et al., 1995), acreditamos que a diminuição e esta deposição de C3d na placenta apontam para o provável aumento da atividade do SC nestas pacientes. O aumento de atividade elevaria a expressão de DAF, como um mecanismo compensatório de controle do SC, e este padrão de expressão permaneceria no endométrio destas mulheres mesmo após as perdas gestacionais.

DAF está presente na membrana plasmática e na membrana acrossômica interna do espermatozóide (CUMMERSON et al., 2006), no epitélio endometrial (JENSEN et al., 1994; NOGAWA FONZAR-MARANA et al., 2006), na placenta (HOLMES et al., 1992; TEDESCO et al., 1993; VANDERPUYE, LABARRERE & McINTYRE, 1993). Deste modo, a presença desta proteína reguladora do SC no trato reprodutivo tanto feminino quanto masculino indica a necessidade de um controle da ativação deste sistema a fim de preservar certas funções reprodutivas, como a fertilização e a implantação, sugerindo assim, um papel essencial desta CRP na manutenção da fertilidade.

Devido ao fato de a perda gestacional precoce ser pobremente entendida e, de o blastocisto ser uma estrutura potencialmente capaz de ativar

o SC no trato genital feminino, os mecanismos para o controle do SC devem estar presentes durante esta fase de implantação, que ocorre entre o 20º e 24º dias do ciclo (BERGH & NAVOT, 1992). O aumento significativo da expressão de DAF e CD59 nas células glandulares endometriais durante esta fase de implantação do blastocisto corroboram com a hipótese de que DAF e CD59 devem ter grande importância no controle do SC durante a nidadação. Ao que parece, os nossos resultados, de aumento acentuado das CRPs, DAF e CD59, na fase secretória intermediária de mulheres diagnosticadas com AER, pode estar relacionado a uma maior sensibilização destas mulheres aos antígenos paternos presentes no tecido fetal. Sendo assim, o aumento de DAF e CD59, no endométrio secretor intermediário destas mulheres pode atuar como um mecanismo compensatório para o controle do SC. Sendo que esta elevação permaneceria no endométrio após os sucessivos abortos, baseado no fato de que durante a gestação há um aumento de DAF e CD59 na decídua materna. Também supomos que o aumento do controle do SC impeça o desenrolar desta cascata em pontos nos quais esta ativação seria essencial e normal para a manutenção e o desenvolvimento do embrião já implantado.

Em suma, a presença das proteínas reguladoras do SC no plasma seminal, no espermatozóide (ROONEY et al., 1993a; SIMPSON et al., 1994), nos fluidos e nos epitélios glandulares do trato reprodutivo (TAUBER et al., 1985; JENSEN et al., 1995), no fluido folicular (D'CRUZ et al., 1990), nos oócitos, no embrião e nas membranas amnióticas (HOLMES et al., 1992; TEDESCO et al., 1993; VANDERPUYE et al., 1993) nos mostra que o controle deste sistema é importante durante todas as fases do processo reprodutivo. Além do mais, a expressão aumentada das CRPs (DAF e CD59) na fase secretória otimiza a proteção das células endometriais durante esta fase, uma

vez que controlam o SC em dois momentos cruciais de sua ativação – o da formação das C3 convertases e o da inserção de C9 na constituição do MAC. Promove-se, assim, a integridade do endométrio humano. Apesar disto, os nossos resultados não suportam a hipótese de que casos de abortos espontâneos de repetição resultem da diminuição ou da ausência das proteínas reguladoras do SC, DAF e CD59, expressas no endométrio humano durante o período de janela imunológica.

O nosso estudo permitiu conhecer a expressão do neoantígeno de C9 e das moléculas reguladoras do Sistema Complemento, DAF e CD59, no endométrio de mulheres com infertilidade secundária por aborto espontâneo de repetição durante a fase secretória do ciclo menstrual. As mulheres que compuseram nosso Grupo Aborto foram selecionadas por terem como único critério dois ou mais abortos espontâneos consecutivos e não explicados. Neste grupo não foram excluídas as pacientes portadoras de Síndrome de Anticorpos Antifosfolípidos, devido à associação desta patologia com o SC. Não há relatos prévios na literatura, até o momento, que avaliem a expressão destas proteínas nesta situação. A partir destes dados, novos estudos podem ser realizados com o intuito de confirmar estatisticamente o aumento da expressão de DAF e CD59 durante a sub-fase secretória intermediária.

Devido ao fato de que até hoje, não se sabe como o SC se comporta nestas situações patológicas, vários estudos presentes na literatura sugerem explicações, como a associação entre o polimorfismo do gene da proteína reguladora do SC, MCP, com abortos espontâneos recorrentes (RISK, FLANAGAN & JOHNSON, 1991) e a deposição de componentes do SC na placenta (GIRARDI et al., 2006b). A partir destes relatos e dos dados encontrados pelo nosso grupo, futuros estudos direcionados para pesquisa do

mRNA destas proteínas, DAF e CD59, no endométrio de mulheres com AER ou para pesquisa de outras proteínas, como os componentes C3, C4 e C5, e outros inibidores do SC, como MCP, podem ser realizados com o intuito de elucidar a relação dos componentes do SC em casos de infertilidade secundária por aborto espontâneo de repetição em humanos.

6 CONCLUSÕES

O Complexo de Ataque à Membrana, representado pelo neoantígeno de C9 (C5b-9), não se expressou nas glândulas endometriais do grupo composto por mulheres com infertilidade secundária por aborto espontâneo de repetição, Grupo Aborto, nem nas do grupo composto por mulheres ovulatórias e férteis, Grupo Controle, durante a fase secretória do ciclo menstrual.

O neoantígeno de C9 (C5b-9), não se expressou no estroma endometrial do Grupo Aborto nem no do Grupo Controle durante a fase secretória do ciclo menstrual.

O neoantígeno de C9 e as CRPs, DAF e CD59, foram detectados no endotélio vascular tanto do Grupo Aborto quanto do Grupo Controle, sem variação com o decorrer da fase secretória do ciclo menstrual.

As proteínas reguladoras do Sistema Complemento, DAF e CD59, estão presentes no endométrio, tanto nas glândulas quanto no estroma, de mulheres com infertilidade secundária por aborto espontâneo de repetição e no de mulheres ovulatórias e férteis.

Houve nítido aumento da expressão de DAF e CD59 na sub-fase secretória intermediária do ciclo menstrual do Grupo Aborto quando comparado com o Grupo Controle. Este aumento não pode ser detectado estatisticamente devido à pequena casuística.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALUVIHARE, V.R.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A.G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. **Nature Immunology**, New York, v. 5(3), p. 266-271, 2004.
- ANDREW, A.; BULMER, J.N.; MORRISON, L.; WELLS, M.; BUCKLEY, C.H. Subinvolution of the uteroplacental arteries: an immunohistochemical study. **International Journal of Gynecological Pathologists**, New York, v. 12(1), p. 28-33, 1993.
- ASCH, A. S.; KINOSHITA, T.; JAFEE, E. A.; NUSSENZWEIG, V. Decay-accelerating factor is present on cultured human umbilical vein endothelial cell. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 163, p. 211-216, 1986.
- BERGH, P.A.; NAVOT, D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. **Fertility and Sterility**, New York, v. 58(3), p. 537-542, 1992.
- BISCHOF, P.; PLANAS-BASSET, D.; MEISSER, A.; CAMPANA, A.; Investigations on the cell type responsible for the endometrial secretion of complement component 3 (C3). **Human Reproduction**, Oxford, v. 9(9), p. 1652-1659, 1994.
- BLOM, A.M.; VILLOUTREIX, B.O.; DAHLBÄCK, B. Functions of human complement inhibitor C4b-binding protein in relation to its structure. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)**, Birkhäuser, v. 52(2), p. 83-95, 2004.
- BOS, I.G.; HACK, C.E.; ABRAHAMS, J.P. Structural and functional aspects of C1-inhibitor. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 205(4-5), p. 518-533, 2002.
- BOZAS, S.E.; KIRSZBAUM, L.; SPARROW, R.L.; WALKER, I.D. Several vascular complement inhibitors are present on human sperm. **Biology of Reproduction**, New York, v. 48(3), p. 503-511, 1993.
- BRANCH, D.W.; ANDRES, R.; DIGRE, K.B.; ROTE, N.S.; SCOTT, J.R. The association of antiphospholipid antibodies with severe preeclampsia. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 73, p. 541-545, 1989.
- BROOIMANS, R.A.; VAN DER ARK, A.A.; TOMITA, M.; VANES, L.A.; DAHA, M.R. CD59 expressed by human endothelial cells functions as a protective molecule against complement-mediated lysis. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 22(3), p. 791-797, 1992.
- CAETANO, M. R.; COUTO, E.; BARINI, R.; SIMONI, R. Z.; PINTO E SILVA, J. L.; CECATTI, J. G.; PEREIRA, B. G. Recurrent spontaneous abortion: associated factors. **Revista Ciências Médicas**, Campinas, v. 15(1), p.47-53, 2006.

- CARRINGTON, B.; SACKS, G.; REGAN, L. Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome. **Current Opinion Obstetrics & Gynecology**, Philadelphia, v. 17(6), p. 591-597, 2005.
- CAUCHETEUX, S.M.; KANELLOPOULOS-LANGEVIN, C.; OJCIUS, D.M. At the innate frontiers between mother and fetus: linking abortion with complement activation. **Immunity**, Cambridge, v. 18(2), p. 169-172, 2003.
- CERVONI, F.; OGLESBY, T.J.; ADAMS, E.M.; MILESIFLUET, C.; NICKELLS, M.; FENICHEL, P.; ATKINSON, J.P.; HSI, B.L. Identification and characterization of membrane cofactor protein of human spermatozoa. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 148(5), p. 1431-1437, 1992.
- CICARDI, M.; ZINGALE, L.; ZANICHELLI, A.; PAPPALARDO, E.; CICARDI, B. C1 inhibitor: molecular and clinical aspects. **Springer Seminars Immunopathology**, Berlin, v. 27(3), p. 286-298, 2005.
- COCHRANE, C.G.; MÜLLER-EBERHARD, H.J. The derivation of two distinct anaphylatoxin activities from the third and fifth components of human complement. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 127(2), p. 371-386, 1968.
- COLE, J.L.; HOUSLEY, G.A. J.R.; DYKMAN, T.R.; MACDERMOTT, R.P.; ATKINSON, J.P. Identification of an additional class of C3-binding membrane proteins of human peripheral blood leukocytes and cell lines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 82(3), p. 859-863, 1985.
- COLTEN, H.R.; ROSEN, F.S. Complement deficiencies. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 10, p. 809-834, 1992.
- COSTA, H. de L.; de MOURA, M.D.; FERRIANI, R.A.; ANCESCHI, M.I.; BARBOSA J.E. Prevalence of anti-cardiolipin antibody in habitual aborters. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, Basel, v. 36(4), p. 221-225, 1993.
- COULAN, C. B.; FAULK, W. P.; McINTYRE, J. A. Overview of recurrent pregnancy loss, In Coulan, Faulk, McIntyre. **Immunological Obstetrics**. **W. W. Norton & Company**. New York-London, p.123-132, 1992.
- COWCHOCK, S.; SMITH, J.B.; GOCIAL, B. Antibodies to phospholipids and nuclear antigens in patients with repeated abortions. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 155(5), p. 1002-10, 1986.
- CUMMERSON, J.A.; FLANAGAN, B.F.; SPILLER, D.G.; JOHNSON, P.M. The complement regulatory proteins CD55 (decay accelerating factor) and CD59 are expressed on the inner acrosomal membrane of human spermatozoa as well as CD46 (membrane cofactor protein). **Immunology**, Palo Alto, v. 118(3), p. 333-42, 2006.
- CUNNINGHAM, D.S.; TICHENOR, J.R. Decay-accelerating factor protects human trophoblast from complement-mediated attack. **Clinical Immunology and Immunopathology**, New York, v. 74(2), p. 156-161, 1995.

- D'CRUZ, O.J.; HAAS, G.G.; LAMBERT, H. Evaluation of antisperm complement-dependent immune mediators in human ovarian follicular fluid. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 144(10), p. 3841-3848, 1990.
- D'CRUZ, O.J.; WILD, R.A. Evaluation of endometrial tissue specific complement activation in women with endometriosis. **Fertility and Sterility**, New York, v. 57(4), p. 787-795, 1992.
- DAFFERN, P.J.; PFEIFER, P.H.; EMBER, J.A.; HUGLI, T.E. C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 181(6), p. 2119-2127, 1995.
- DAVIES, A.; SIMMONS, D.L.; HALE, G.; HARRISON, RA.; TIGHE, H.; LACHMANN, P.J.; WALDMANN, H. CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 170(3), p. 637-54, 1989.
- DAVIS, A.E.; MEJIA, P.; LU, F. Biological Activities of C1 inhibitor. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 45(16), p. 4057-4063, 2008.
- DISCIPIO, R.G. Ultrastructures and interactions of complement factors H and I. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 149(8), p. 2592-2599, 1992.
- DUDLEY, D.J.; BRANCH, D.W. New approaches to recurrent pregnancy loss. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 32(3), p. 520-532, 1989. Em: SOUSA, S.S.; VOLTARELLI, J.C.; FERRIANI, R.A. *Imunologia da Reprodução. Medicina*, Ribeirão Preto, v. 30, p. 277-288, 1997.
- EDMONDS, D.K.; LINDSAY, K.S.; MILLER, J.F.; WILLIAMSON, E.; WOOD, P.J. Early embryonic mortality in women. **Fertility and Sterility**, New York, v. 38(4), p. 447-453, 1982.
- FENICHEL, P.; CERVONI, F.; HOFMANN, P.; DECKERT, M.; EMILIOZZI, C.; HIS, BL.; ROSSI, B. Expression of the complement regulatory protein CD59 on human spermatozoa: characterization and role in gametic interaction. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 38(3), p. 338-346, 1994.
- FENICHEL, P.; CERVONI, F.; DONZEAU, M.; HIS, B.L. Expression and role of complement regulatory proteins on human gametes and pre-implantation embryos. **Contraception, Fertilité, Sexualité**, Paris, v. 23(9), p. 576-580, 1995.
- FRANCIS, J.; RAI, R.; SEBIRE, N.J.; EL-GADDAL, S.; FERNANDES, M.S.; JINDAL, P.; LOKUGAMAGE, A.; REGAN, L.; BROSENS, J.J. Impaired expression of endometrial differentiation markers and complement regulatory proteins in patients with recurrent pregnancy loss associated with antiphospholipid syndrome. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 12(7), p. 435-442, 2006.

- FUJITA, T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. **Nature Reviews. Immunology**, London, v. 2(5), p. 346-353, 2002.
- GERARRD, C.; HUGLI, T.E. Identification of classical anaphylatoxin as the des-Arg form of the C5a molecule: evidence of a modulator role for the oligosaccharide unit in human des-Arg74-C5a. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 78(3), p. 1833-7, 1981.
- GIRARDI, G.; BERMAN, J., REDECHA, P.; SPRUCE, L.; THURMAN, J.M.; KRAUS, D.; HOLLMANN, T.J.; CASALI, P.; CAROLL, M.C.; WETSEL, R.A.; LAMBRIS, J.D.; HOLERS, V.M.; SALMON, J.E. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome, **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 112, p. 1644–1654, 2003.
- GIRARDI, G.; SALMON, J.B. The role of complement in pregnancy and fetal loss. **Autoimmunity**, Chur, v. 36(1), p. 19-26, 2003.
- GIRARDI, G.; BULLA, R.; SALMON, J.E.; TEDESCO, F. The complement system in the pathophysiology of pregnancy. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 43(1-2), p.68-77, 2006a.
- GIRARDI, G.; YARILIN, D.; THURMAN, J.M.; HOLERS, V.M.; SALMON, J.E. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 203(9), p. 2165-2175, 2006b.
- GIRARDI, G. Complement inhibition keeps mothers calm and avoids fetal rejection. **Immunological Investigations**, New York, v. 37(5), p. 645-59, 2008.
- GIUDICE, L.C.; FERENCZY, A. The endometrial cycle. In: ADASHI, E.Y.; ROCK, J.A.; ROSENWAKS, Z. **Reproductive Endocrinology, Surgery and Technonology**. Philadelphia, v. 1, p. 272-300, 1996.
- GORSKI, J.P., HUGLI, T.E., MULLER-EBERHARD, H.J. C4a: the third anaphylatoxin of the human complement system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 76(10), p. 5299-5302, 1979.
- HAHN, S.; GUPTA, A.K.; TROEGER, C.; RUSTERHOLZ, C.; HOLZGREVE, W. Disturbances in placental immunology: ready for therapeutic interventions? **Springer Seminars Immunopathology**, Berlin, v. 27(4), p. 477-493, 2006.
- HARTMANN, K.; HENZ, B.M.; KRUGER-KRASAGAKES, S.; KOHL, J.; BURGER, R.; GUHL, S.; HAASE, I.; LIPPERT, U.; ZUBERBIER, T. C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. **Blood**, New York, v. 89(8), p. 2863-2870, 1997.
- HASTY, L.A.; LAMBRIS, J.D.; LESSEY, B.A.; PRUKSANANONDA, K.; LYTTLE, C.R. Hormonal regulation of complement components and receptors throughout the menstrual cycle. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 170(1 Pt 1), p. 168-175, 1994.

- HILL, J.A. Immunological contributions to recurrent pregnancy loss. **Bailliere's Clinical of Obstetrics and Gynaecology**, London, v. 6(3), p. 489-505, 1992.
- HILL, J.A.; POLGAR, K.; ANDERSON, D.J. T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. **JAMA: The Journal of American Medical Association**, Chicago, v. 273(24), p. 1933-1936, 1995.
- HOFFMANN, E.M. Inhibition of complement by a substance isolated from human erythrocytes. II. Studies on the site and mechanism of action. **Immunochemistry**, Bloxham, v. 6(3), p. 405-419, 1969.
- HOLERS, V.M.; GIRARDI, G.; MO, L.; GUTHRIDGE, J.M.; MOLINA, H.; PIAERNGELI, S.S.; ESPINOLA, R.; XIAOWEI, L.E.; MAO, D.; VIALPANDO, C.G.; SALMON, J.E. Complement C3 activation is required for antiphospholipid antibody-induced fetal loss, **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 195, p. 211-220, 2002.
- HOLMES, C. H.; SIMPSON, K. L.; WAINWRIGHT, S. D.; TATE, C. G.; HOULIHAN, J. M.; SAWYER, I. H.; ROGERS, I. P.; SPRING, F. A.; ANSTEE, D.J.; TANNER, M. J. Preferential expression of the complement regulatory protein decay accelerating factor at the fetomaternal interface during human pregnancy. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 144, p. 3099-4009, 1990.
- HOLMES, C.H.; SIMPSON, K.L. Complement and pregnancy: new insights into the immunobiology of the fetomaternal relationship. **Bailliere's Clinical of Obstetrics and Gynaecology**, London, v. 6(3), p. 439-460, 1992.
- HOLMES, C. H.; SIMPSON, K. L.; OKADA, H.; OKADA, N.; WAINWRIGHT, S. D.; PURCELL, D. F.; HOULIHAN, J. M. Complement regulatory proteins at the fetomaternal interface during human placental development: distribution of CD59 by comparison with membrane cofactor protein (CD46) and decay accelerating factor (CD55). **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 22, p. 1579-1585, 1992.
- HOURCADE, D.; LISZEWSKI, M.K.; KRYCH-GOLDBERG, M.; ATKINSON, J.P. Functional domains, structural variations and pathogen interactions of MCP, DAF and CR1. **Immunopharmacology**, New York, v. 49(1-2), p. 103-116, 2000.
- HIS, B.L.; HUNT, J.S.; ATKINSON, J.P. Differential expression of complement regulatory proteins on subpopulations of human trophoblast cells. **Journal Reproductive Immunology**, Limerick, v. 19(3), p. 209-223, 1991.
- HUGHES, G.R. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. **British Medical Journal (Clinical Research Ed)**, London, v. 287(6399), p. 1088-1099, 1983.
- IBORRA, A.; MAYORGA, M.; LLOBET, N.; MARTÍNEZ, P. Expression of complement regulatory proteins [membrane cofactor protein (CD46), decay accelerating factor (CD55), and protectin (CD59)] in endometrial stressed cells. **Cellular Immunology**, New York, v. 223, p. 46-51, 2003.

- IMRIE, H.J.; MCGONIGLE, T.P.; LIU, D.T.; JONES, D.R. Reduction in erythrocyte complement receptor 1 (CR1, CD35) and decay accelerating factor (DAF, CD55) during normal pregnancy. **Journal Reproductive Immunology**, Limerick, v. 31(3), p. 221-227, 1996.
- ISAACSON, K.B.; GALMAN, M.; COUTIFARIS, C.; LYTTLE, C.R. Endometrial synthesis and secretion of complement component-3 by patients with and without endometriosis. **Fertility and Sterility**, New York, v. 53(5), p. 836-841, 1990.
- JAMES, K. Complement: activation, consequences, and control. **Journal of the American Medical Technologists**, Park Ridge, v. 48(9), p. 735-742, 1982.
- JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA J.D. **Imunobiologia**, 4ª edição, Ed. Artmed, Porto Alegre, 2000.
- JENSEN, T.S.; BJØRGE, L.; WOLLEN, A.L.; ULSTEIN, M. Identification of the complement regulatory proteins CD46, CD55, and CD59 in human fallopian tube, endometrium, and cervical mucosa and secretion. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v. 34(1), p. 1-9, 1995.
- JIANG, H.; PILLAI, S. Complement regulatory proteins on the sperm surface: relevance to sperm motility. **American Journal Reproductive Immunology**, New York, v. 39(4), p. 243-28, 1998.
- JOHNSTONE, R.W.; LOVELAND, B.E.; MCKENZIE, I.F.C Identification and quantification of complement regulator CD46 on normal tissues. **Immunology**, Oxford, v., 79, p. 341-347, 1993.
- JÓZSI, M.; MANUELIAN, T.; HEINEN, S.; OPPERMAN, M.; ZIPFEL, P.F. Attachment of the soluble complement regulator factor H to cell and tissue surfaces: relevance for pathology. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 19(1), p. 251-258, 2004.
- KANERIA, M.V.; VISHWANATHAN, C. A preliminary study of antiphospholipid antibodies in 50 cases of bad obstetric history. **The Journal Association of Physicians of India**, Bombay, v. 47(7), p. 669-672, 1999.
- KAUL, A.; NAGAMANI, M.; NOWICKI, B. Decreased expression of endometrial decay accelerating factor (DAF), a complement regulatory protein, in patients with luteal phase defect. . **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v. 34, p. 236-240, 1995.
- KAUL, A.; KUMAR, D.; NAGAMANI, M.; GOLUSKO, P.; NOWICKI, S.; NOWICKI, B. Rapid Cyclic changes in density and accessibility of endometrial ligands for Escherichia coli Dr Fimbriae. **Infection and Immunity**, Washington, v. 64(2), p. 611-615, 1996.
- KINOSHITA, T.; MEDOF, M.E.; NUSSENZWEIG, V. Endogenous association of decay-accelerating factor (DAF) with C4b and C3b on cell membranes. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 136(9), p. 3390-3409, 1986.

- Landi AP, Wilson AB, Davies A, Lachmann PJ, Ferriani VP, Seilly DJ, Assis-Pandochi AI. Determination of CD59 protein in normal human serum by enzyme immunoassay, using octyl-glucoside detergent to release glycosyl-phosphatidylinositol-CD59 from lipid complex. **Immunology Letters**, Amsterdam, 2003 Dec 15;90(2-3):209-13.
- LEHTO, T.; HONKANEN, E.; TEPPONEN, A.M.; MERI, S. Urinary excretion of protectin (CD59), complement SC5b-9 and cytokines in membranous glomerulonephritis. **Kidney International**, New York, v. 47(5), p. 1403-1411, 1995.
- LESAVRE, P.H.; MULLER-EBERHARD, H.J. Mechanism of action of factor D of the alternative complement pathway. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 148(6) p. 1498-1509, 1978.
- LEVINE, J.S.; BRANCH, D.W.; RAUCH, J. The antiphospholipid syndrome. **The New England Journal of Medicine**, Melbourn, v. 346, p. 752–763, 2002.
- LISANTI, M.P.; RODRIGUEZ-BOULAN, E. Glycophospholipid membrane anchoring provides clues to mechanism of protein sorting in polarized epithelial cells. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 15, p. 113-118, 1990.
- LISZEWSKI, M.K.; FARRIES, T.C.; LUBLIN, D.M.; ROONEY, I.A.; ATKINSON, J.P. Control of the complement system. **Advances in Immunology**, New York, v. 61, p. 201-283, 1996.
- LOBO, S.C.; HUANG, S.T.; GERMEYER, A.; DOSIOU, C.; VO, K.C.; TULAC, S.; NAYAK, N.R.; GIUDICE, L.C. The immune environment in human endometrium during the window of implantation. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v. 52(4), p. 244-251, 2004.
- LOCKSHIN, M.D.; SAMMARITANO, L.R.; SCHWARTZMAN, S.; Validation of the Sapporo criteria for antiphospholipid syndrome. **Arthritis and rheumatism**, Atlanta, v. 43, p. 440–443, 2000.
- LUBLIN, D.M.; ATKINSON, J.P. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. **Annual review of immunology**, Palo Alto, v. 7, p. 35-58, 1989.
- McINTYRE, J.A.; COULAM, C.B.; FAULK, W.P. Recurrent spontaneous abortion. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v. 21(3-4), p. 100-104, 1989.
- McLAUGHLIN, P.J.; HOLLAND, S.J.; TAYLOR, C.T.; OLAH, K.S.; LEWIS-JONES, D.I.; HARA, T.; SEYA, T.; JOHNSON, P.M. Soluble CD46 (membrane cofactor protein, MCP) in human reproductive tract fluids. **J Reprod Immunol.**, v.31(3), p. 209-219, 1996.
- MAO, D.; WU, X.; DEPPONG, C.; FRIEND, L.D.; DOLECKI, G.; NELSON, M.; MOLINA, H. Negligible role of antibodies and C5 in pregnancy loss associated exclusively with C3-dependent mechanisms through complement alternative pathway. **Immunity**, Cambridge, v. 9(6), p. 813-822, 2003.

- MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 176(6), p. 1497-1502, 1992.
- MEDAWAR, P. Biological problems of skin surgery. **International Society of Surgery**, Bruxelles, 1953.
- MEDICUS, R.G.; SCHREIBER, R.D.; GÖTZE, O.; MÜLLER-EBERHARD, H.J. A molecular concept of the properdin pathway. . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 73(2), p. 612-616, 1976.
- MEDOF, M.E.; WALTER, E.I.; RUTGERS, J.L.; KNOWLES, D.M.; NUSSENZWEIG, V. Identification of the complement decay-accelerating factor (DAF) on epithelium and glandular cells and in body fluids. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 165(3), p. 848-864, 1987.
- MERI, S.; WALDMANN, H.; LACHMANN, P.J. Distribution of protectin (CD59), a complement membrane attack inhibitor, in normal human tissues. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, New York, v. 65(5), p. 532-537, 1991.
- MICHELOUD, D.; SARMIENTO, E.; TEIJEIRO, R.; JENSEN, J.; RODRÍGUEZ MOLINA, J.J.; FERNÁNDEZ-CRUZ, E.; CARBONE, J. Hypocomplementemia in the absence of autoantibodies in women with recurrent pregnancy loss. **Allergologia et immunopathologia**, Madrid, v. 35(3), p. 90-94, 2007.
- MOLINA, H. The murine complement regulator Crry: new insights into the immunobiology of complement regulation. **Cellular Molecular Life Sciences**, Basel, v. 59(2), p. 220-229, 2002.
- MOLLNES, T.E.; HARBOE, M. Immunohistochemical detection of the membrane and fluid-phase terminal complement complexes C5b-9(m) and SC5b-9. Consequences for interpretation and terminology. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 26(4), p. 381-386, 1987.
- MOLLNES, T.E. & LACHMANN, P.J. Regulation of complement. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 27, p. 127-142, 1988.
- MORGAN, B.P.; MERI, S. Membrane proteins that protect against complement lysis. **Springer Seminars Immunopathology**, Berlin, v. 15(4), p. 369-396, 1994.
- MORGAN, B.P.; HARRIS, C.L. Complement regulatory proteins, eds, **Academic Press**, London, 1999.
- MORLEY, B.J.; WALPORT, M.J. The complement facts book, eds, **Academic Press**, London, 2000.
- MUNN, D.H.; ZHOU, M.; ATTWOOD, J.T.; BONDAREV, I.; CONWAY, S.J.; MARSHALL, B.; BROWN, C.; MELLOR, A.L. Prevention of allogeneic fetal

- rejection by tryptophan catabolism. **Science**, New York, v. 281(5380), p. 1191-1193, 1998.
- NANGAKU, M. Complement regulatory proteins in glomerular diseases. **Kidney International**, New York, v. 54(5), p. 1419-1128, 1998.
 - NICHOLSON-WELLER, A.; BURGE, J.; FEARON, D.T.; WELLER, P.F.; AUSTEN, K.F. Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay-accelerating activity for C3 convertases of the complement system. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 129(1), p. 184-189, 1982.
 - NICHOLSON-WELLER, A.; WANG, C.E. Structure and function of decay accelerating factor CD55. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 123(4), p. 485-491, 1994.
 - NINOMYA, H.; SIMS, P.J. The human complement regulatory protein CD59 binds to the alpha-chain of C8 and to the "b" domain of C9. **The Journal of Biological Chemistry**, Sao Francisco, v. 267(19), p. 13675-13680, 1992.
 - NOGAWA FONZAR-MARANA, R.R.; FERRIANI, R.A.; SOARES, S.G.; CAVALCANTE-NETO, F.F.; TEIXEIRA, J.E.; BARBOSA, J.E. Expression of complement system regulatory molecules in the endometrium of normal ovulatory and hyperstimulated women correlate with menstrual cycle phase. **Fertility and Sterility**, New York, v. 86(3), p. 758-761, 2006.
 - PANGBURN, M.K. Activation of complement via the alternative pathway. **Federations Proceedings**, Washigton, v. 42(1), p.139-143, 1983.
 - PANGBURN, M.K.; MÜLLER-EBERHARD, H.J. Initiation of the alternative complement pathway due to spontaneous hydrolysis of the thioester of C3. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 421, p. 291-298, 1983.
 - PANGBURN, M.K.; MÜLLER-EBERHARD, H.J. The alternative pathway of complement. **Springer Seminars Immunopathology**, Berlin, v. 7(2-3), p. 163-92, 1984.
 - PARKER, C.J. Membrane defenses against attack by complement and perforins. Current topics in microbiology and immunology. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, Berlin, v. 178, 1992.
 - PENNESI, G.; BRIOLI, G.; LULLI, P.; MARIANI, B.; MORELLINI, M.; NICOTRA, M.; TRABACE, S. HLA and complement factors alleles sharing in Italian couples with recurrent spontaneous abortions. **Human Immunology**, New York, v. 59(6), p. 382-386, 1998.
 - PERMULTER, D. H.; COLTEN, H. R. Molecular immunobiology of complement biosynthesis: a model of single-cell control of effector-inhibitor balance. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 4, p. 231-51, 1986.
 - PETRI, M.; QAZI, U. Management of antiphospholipid syndrome in pregnancy. **Rheumatic diseases clinics of North**, Philadelphia, v. 32, p. 591-607, 2006.

- PILLEMER, L.; BLUM, L.; LEPOW, I.H.; WURZ, L.; TODD, E.W. The properdin system and immunity. III. The zymosan assay of properdin. **The Journal Experimental Medicine**, New York, v.103(1), p.1-13, 1956.
- PODACK, E.R.; KOLB, W.P.; MÜLLER-EBERHARD, H.J. The SC5b-7 complex: formation, isolation, properties, and subunit composition. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 119(6), p. 2024-2029, 1977.
- PODACK, E.R. Molecular composition of the tubular structure of the membrane attack complex of complement. **The Journal of Biological Chemistry**, Sao Francisco, v. 259(13), p. 8641-8647, 1984.
- QUENBY, S.M.; FARQUHARSON, R.G. Predicting recurring miscarriage: what is important? **Obstetrics and Gynecology**, London, v. 82(1), p. 132-138, 1993.
- RAI, R.S.; REGAN, L.; CLIFFORD, K.; PICKERING, W.; DAVE, M.; MACKIE, I.; McNALLY, T.; COHEN, H. Antiphospholipid antibodies and beta 2-glycoprotein-I in 500 women with recurrent miscarriage: results of a comprehensive screening approach. **Human Reproduction**, Oxford, v. 10(8), p. 2001-2005, 1995.
- RAMPERSAD, R.; BARTON, A.; SADOVSKY, Y.; NELSON, D.M. The C5b-9 membrane attack complex of complement activation localizes to villous trophoblast injury in vivo and modulates human trophoblast function in vitro. **Placenta**, London, v. 29(10), p. 855-861, 2008.
- RATNOFF, W.D.; BROCKMAN, W.W.; HASTY, L.A. Immunohistochemical localization of C9 neoantigen and the terminal complement inhibitory protein CD59 in human endometrium. **American Journal of Reproductive Immunology**, New York, v. 34(2), p. 72-79. 1995.
- REESE, J.; DAS, S.K.; PARIJA, B.C.; LIM, H.; SONG, H.; MATSUMOTO, H.; KNUDTSON, K.L.; DUBOIS, R.N.; DEY, S.K. Global gene expression analysis to identify molecular markers of uterine receptivity and embryo implantation. **The Journal of Biological Chemistry**, Sao Francisco, v. 276(47), p. 44137-44145, 2001.
- RICHANI, K.; SOTO, E.; ROMERO, R.; ESPINOZA, J.; CHAIWORAPONGSA, T.; NIEN, J.K.; EDWIN, S.; KIM, Y.M.; HONG, J.S.; MAZOR, M. Normal pregnancy is characterized by systemic activation of the complement system. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, Boca Raton, v. 17(4), p. 239-245, 2005.
- RISK, J.M.; FLANAGAN, B.F.; JOHNSON, P.M. Polymorphism of the human CD46 gene in normal individuals and in recurrent spontaneous abortion. **Human Immunology**, New York, v. 30, p. 162-167, 1991.
- ROLLINS, S.A.; SIMS, P.J. The complement-inhibitory activity of CD59 resides in its capacity to block incorporation of C9 into membrane C5b-9. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 144(9), p. 3478-3483, 1990.

- ROONEY, I. A.; DAVIES, A.; MORGAN, B. P. Membrane attack complex-mediated damage to spermatozoa: protection of the cell by presence on their membranes of MAC inhibitory proteins. **Immunology**, New York, v. 75, p. 499-506, 1992.
- ROONEY, I.A.; ATKINSON, J.P.; KRULL, E.S.; SCINFELD, G; POLAKOSKI, K.; SAFFITZ, J.E.; MORGAN, B.P Physiologic relevance of the membrane attack complex inhibitory protein CD59 in human seminal plasma: CD59 is present on extracellular organelles (prostasomes), binds cell membranes and inhibits complement mediated lysis. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 177, p. 1409-1420, 1993a.
- ROONEY, I.A.; OGLEBSY, T.J.; ATKINSON, J.P. Complement in human reproduction: activation and control. **Immunologic Research**, Basel, v. 12, p. 276-294, 1993b.
- ROOS, A.; BOUWMAN, L.H.; VAN GIJLSWIJK-JANSSEN, D.J.; FABER-KROL, M.C.; STAHL, G.L.; DAHA, M.R. Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 167(5), p. 2861-2868, 2001.
- SALMON, J. E. A noninflammatory pathway for pregnancy loss: Innate immunity activation? **The Journal Clinical of Investigation**, New Haven, v. 114(1), p. 15-17, 2004.
- SALMON, J.E.; GIRARDI, G. Antiphospholipid antibodies and pregnancy loss: a disorder of inflammation. **Journal of Reproductive Immunology**, Amsterdam, v. 77(1), p. 51-56, 2008.
- SAYEGH, R.A.; TAO, X.J.; AWWAD, J.T.; ISAACSON, K.B. Localization of the expression of complement component 3 in the human endometrium by in situ hybridization. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 81(4), p. 1641-1649, 1996.
- SCHMIDT, A.; GROTH, P.; HAENDLER, B.; HESS-STUMPP, H.; KRÄTZSCHMAR, J.; SEIDEL, H.; THAELE, M.; WEISS, B. Gene expression during the implantation window: microarray analysis of human endometrial samples. **Ernst Schering Research Foundation Workshop**, Berlin, v. 52, p. 139-157, 2005.
- SHAMONKI, J.M.; SALMON, J.E.; HYJEK, E.; BAERGEN, R.N. Excessive complement activation is associated with placental injury in patients with antiphospholipid antibodies. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 196(2), p. 167.e1-167.e5, 2007.
- SHI, S.R.; COTE, R.J.; TAYLOR, C.R. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, Baltimore, v. 45, p. 327-344, 1997.
- SIM, R.B.; KÖLBLE, K.; McALEER, M.A.; DOMINGUEZ, O.; DEE, V.M. Genetics and deficiencies of the soluble regulatory proteins of the complement system. **International Review of Immunology**, Chur, v. 10(1), p. 65-86, 1993.

- SINHA, D.; WELLS, M.; FAULK, W.P. Immunological studies of human placenta: complement components in pre-eclamptic chorionic villi. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 56(1), p. 175-184, 1984.
- SMITH, C.A.; PANGBURN, M.K.; WILHELM VOGEL, C.; MÜLLER-EBERHARD, H.J. Molecular Architecture of Human Properdin, a Positive Regulator of the Alternative Pathway of Complement. **The Journal of Biological Chemistry**, Sao Francisco, v. 259(7), p. 4582-4588, 1984.
- SOUSA, S.S., VOLTARELLI, J.C., FERRIANI, R.A. Imunologia da Reprodução. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 30., p. 277-288, 1997.
- SOUSA, S.S.; FERRIANI, R.A.; PONTES, A.G.; ZAGO, M.A.; FRANCO, R.F. Factor V leiden and factor II G20210A mutations in patients with recurrent abortion. **Human Reproduction**, Oxford, v. 14(10), p. 2448-2450, 1999.
- SOUSA, S. S.; FERRIANI, R. A.; SANTOS, C. M. P.; VOLTARELLI, J. C. Immunological evaluation of patients with recurrent abortion. **Journal of Reproductive Immunology**, Amsterdam, v.56(1-2), p. 111-121, 2002.
- STIRRAT, G.M. Recurrent miscarriage I: definition and epidemiology. **Lancet**, London, v. 336, p. 673-5, 1990.
- STIRRAT, G.M. Recurrent spontaneous abortion. In: Coulam, C.B., Faulk, W.P., McIntrud, J.A. (ed.). **Immunologic Obstetrics**, W.W. Norton & Company, New York- London, p. 357-376, 1992.
- STHOEGER, Z.M.; MOZES, E.; TARTAKOVSKY, B. Anti-cardiolipin antibodies induce pregnancy failure by impairing embryonic implantation. . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90(14), p. 6464-6467, 1993.
- STROWITZKI, T.; GERMEYER, A.; POPOVICI, R.; VON WOLFF, M. The human endometrium as a fertility-determining factor. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 12(5), p. 617-630, 2006.
- SUGITA, Y., NAKANO, Y.; TOMITA, M. Isolation from human erythrocytes of a new membrane protein which inhibits the formation of complement transmembrane channels. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 104(4), p. 633-637, 1988.
- TABIBZADEH, S. Molecular control of the implantation window. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 4(5), p. 465-471, 1998.
- TANDON, N.; YAN, S.L.; MORGAN, B.P.; WEETMAN, A.P. Expression and function of multiple regulators of complement activation in autoimmune thyroid disease. **Immunology**, New York, v. 81(4), p. 643-647, 1994.
- TAUBER, P.F.; WETTICH, W.; NOHLEN, M.; ZANEVELD, L.J. Diffusible proteins of the mucosa of the cervix, uterus and fallopian tubes: distribution and variations during the menstrual cycle. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St Louis, v. 151, p. 1115-1125, 1985.

- TAYLOR, C.T.; BILJAN, M.M.; KINGSLAND, C.R.; JOHNSON, P.M. Inhibition of human spermatozoon-oocyte interaction in vitro by monoclonal antibodies to CD46 (membrane cofactor protein). **Human Reproduction**, Oxford, v. 9(5), p. 907-911, 1994.
- TAYLOR, C.T.; JOHNSON, P.M. Complement-binding proteins are strongly expressed by human preimplantation blastocysts and cumulus cells as well as gametes. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 2(1), p. 52-59, 1996.
- TEDESCO, F.; RADILLO, O.; CANDUSSI, G.; NAZZARO, A.; MOLLNES, T.E.; PECORARI, D. Immunohistochemical detection of terminal complement complex and S protein in normal and pre-eclamptic placentae. **Clinical Experimental Immunology**, Oxford, v. 80(2), p. 236-240, 1990.
- TEDESCO, F.; NARCHI, G.; RADILLO, O.; MERI, S.; FERRONE, S.; BETTERLE, C. Susceptibility of human trophoblast to killing by human complement and the role of the complement regulatory proteins. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 151(3), p. 1562-1570, 1993.
- TICHENOR, J.R.; BLEDSOE, L.B.; OPSAHL, M.S.; CUNNINGHAM, D.S. Activation of complement in humans with a first-trimester pregnancy loss. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, Basel, v. 39(2), p. 79-82, 1995.
- TRUEDSSON, L.; WESTBERG, J.; FREDRIKSON, G.N.; SJÖHOLM, A.G.; KUIJPER, E.J.; FIJEN, C.A.; SPÄTH, P.J.; UHLÉN, M. Human properdin deficiency has a heterogeneous genetic background. **Immunopharmacology**, New York, v. 38(1-2), p. 203-206, 1997.
- TURNER, M.W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 17(11), p. 532-540, 1996.
- VAN DE GEIJN, F.E.; DOLHAIN, R.J.; VAN RIJS, W.; HAZES, J.M.; DE GROOT, C.J. Mannose-binding lectin genotypes and pre-eclampsia: a case-control study. **Human Immunology**, New York, v. 68(11), p. 888-893, 2007.
- VANDERPUYE, O.A.; LABARRERE, C.A.; McINTYRE, J.A. The complement system in human reproduction. **American Journal Reproductive Immunology**, New York, v. 27(3-4), p. 145-155, 1992.
- VANDERPUYE, O.A.; LABARRERE, C.A.; McINTYRE, J.A. Expression of CD59, a human complement system regulatory protein, in extraembryonic membranes. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 101, p. 376-384, 1993.
- XU, C.; MAO, D.; HOLERS, V.M.; PALANCA, B.; CHENG, A.M.; MOLINA, H. A critical role for murine complement regulator crry in fetomaternal tolerance. **Science**, Washington, v. 287(5452), p. 498-501, 2000.
- WEILER, J.M.; DAHA, M.R.; AUSTEN, K.F.; FEARON, D.T. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 73(9), p. 3268-3272, 1976.

- YOUNG, S.L.; LESSEY, B.A.; FRITZ, M.A.; MEYER, W.R.; MURRAY, M.J.; SPECKMAN, P.L.; NOWICKI, B.J. In vivo and in vitro evidence suggest that HB-EGF regulates endometrial expression of human decay-accelerating factor. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 87(3), p. 1368-1375, 2002.
- ZICCARDI, R.J. A new role for C-1-inhibitor in homeostasis: control of activation of the first component of human complement. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 128(6), p. 2505-2508, 1982.

ANEXO A

DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DO GRUPO ABORTO RECORRENTE

Registro:

Nome:

DN:

DUM:

G P A

Abortos:

Clínica:

Exames:

- FSH:
- LH:
- PRL:
- TSH:
- T3:
- T4:
- T4 livre:
- Progesterona:

- Glicemia de jejum:
- Insulina Basal:

- Hemograma com contagem de plaquetas:
- Tipo Sanguíneo:

- Anticorpo antitireoglobulina (anti-TGO):
- Anticorpo antiperoxidase (anti-TPO):
- Fator antinúcleo (FAN):
- Anticorpos anticardiolipina (ACA):
- anti- β 2 glicoproteína I (anti- β 2 GPI):
- Pesquisa do inibidor lúpico (PIL):
- TCK:
- DRVVT:
- Tempo de Protrombina (TP):
- Tempo de tromboplastina Parcial Ativada (TTPA):
- Tempo de Trombina (TT):
- Homocisteína:

HIPERANDROGENISMO

- DHEAS:
- Testosterona:
- 17OHP: FF (10 a 130 FF)
- Ca 125:

Perdas gestacionais abaixo de 20 semanas:

- Fator V de Leiden:
- FII G20210A:

Sorologias:

- VDRL(sífilis):
- HBsAg (Hepatite B):
- anti-HBc (Hepatite B):
- anti-HCV:
- anti-HIV:
- toxoplasmose IgG:
- toxoplasmose IgM :
- rubéola IgG:

Outros:

- US transvaginal:
- Histerossalpingografia:
- Histeroscopia:
- Laparoscopia:
- Cariótipo do casal:
- Citologia cérvico-vaginal:
- swab endocervical:

-genética:

ESPERMOGRAMA:

- Volume:
- pH:
- Vitalidade:
- Concentração de espermatozoides:
- Motilidade:
- Morfologia:
- espermocultura:

Resultado da Biópsia Endometrial:

ANEXO B

Termo de consentimento pós-informação

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campos Universitário Monte Alegre - Fone: 602-1000 - Fax: 633-1144
CEP: 14048-900 Ribeirão Preto - São Paulo.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa:

Expressão endometrial das moléculas reguladoras do Sistema Complemento, DAF e CD59, em pacientes inférteis e mulheres com histórico de abortos recorrentes.

Pesquisador responsável: Dr. Rui Alberto Ferriani – CRM/SP: 37.642.

1. Justificativa e objetivo da pesquisa:

Queremos com este estudo avaliar seu endométrio (camada mais interna do útero) para alguns fatores relacionados à resposta imunológica da mãe para receber um embrião. Faremos uma biópsia do endométrio (retirada de uma pequena amostra de seu endométrio) para ver a influência dos hormônios sobre este tecido e verificar a fase do ciclo menstrual. Vale ressaltar que o material da biópsia de endométrio pode fazer parte da coleta de rotina do setor, para estudo de seu endométrio sobre possíveis causas de infertilidade ou de perda gestacional, entretanto a biópsia de endométrio será colhida somente com finalidade de pesquisa.

2. Os procedimentos que serão utilizados e seus propósitos:

Para estudar o endométrio, é necessário realizar uma biópsia dentro do útero. Neste estudo, ela será feita após sua ovulação, que deverá ser determinada por exames de ultra-som. A biópsia de endométrio é colhida com uma sonda plástica bem fina, de ponta romba atraumática, e somente será realizada caso não haja resistência do colo do útero para passagem da mesma, evitando assim o risco de perfuração uterina. Os pedacinhos de endométrio colhidos ficarão armazenados no freezer e serão enviados para análise no laboratório. Será estudado o sistema complemento destas biópsias. Além disso, para confirmar sua ovulação, será colhido sangue (10 ml) para dosagem de progesterona. Este material será guardado em um freezer no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, identificado por um número, de forma a garantir o sigilo de sua identidade. Esta sobra de sangue e o fragmento de tecido guardado poderá ser utilizado para novos exames ou para pesquisa, e a Sra será informada de possíveis informações adquiridas a partir deste material e poderá se beneficiar das descobertas que ocorrerem em estudos com o seu material.

3. Os desconfortos e riscos esperados:

As biópsias do endométrio dentro do útero tem como principal risco a perfuração do útero e, mais raramente pode ter infecção da cavidade uterina ou um pequeno sangramento. Estes riscos são pequenos, e só será feita caso não haja resistência do colo do útero. Um desconforto leve pode ocorrer quando passa pelo colo do útero. A coleta de sangue causa um pequeno desconforto na punção.

4. Formas de ressarcimento e indenização:

Não haverá recompensa financeira para os pacientes que participarem do estudo. Quanto à indenização, esclarecemos que se trata de um projeto sem financiamento externo e que será desenvolvido com recursos próprios da instituição. Assim sendo, não há uma previsão de seguro para cobertura de indenização. Neste sentido, este projeto não se diferencia dos outros que não contam com financiamento externo, e que ainda assim, são regularmente desenvolvidos sob responsabilidade do pesquisador e da Instituição correspondente. Entretanto, em nenhum momento

desconsidera-se o direito da paciente obter indenização por eventuais danos que julgar pertinente.

Eu,

RG Nº _____, abaixo assinada, tendo sido devidamente esclarecida sobre todas as condições de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado “Expressão endometrial das moléculas reguladoras do Sistema Complemento, DAF e CD59, em pacientes inférteis e mulheres com histórico de abortos recorrentes” que tem como pesquisador responsável Dr Rui Ferriani, especialmente no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos que serei submetida, aos riscos e aos benefícios, à forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como a forma de indenização por danos decorrentes da pesquisa, de claro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido;
2. A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento;
3. A segurança de que não serei identificada e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade;
4. O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando;
5. O compromisso de que serei devidamente acompanhada e assistida durante todo o período de minha participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Declaro ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Assinatura da paciente

Rui Alberto Ferriani
Pesquisador Responsável
CRM/SP 37.642
Fone para contato: (16) 3602 2815