

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

Expressão da elafina nas tubas uterinas com hidrossalpinge

Autor: Ernesto de Paula Guedes Neto  
Orientador: Prof. Ricardo Francalacci Savaris

Tese de Doutorado

2013

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas

Expressão da elafina nas tubas uterinas com hidrossalpinge

Autor: Ernesto de Paula Guedes Neto  
Orientador: Prof. Ricardo Francalacci Savaris

Tese de Doutorado

2013

ii

CIP - Catalogação na Publicação

de Paula Guedes neto, Ernesto  
Expressão da elafina nas tubas uterinas com  
hidrossalpinge / Ernesto de Paula Guedes neto. --  
2013.  
77 f.

Orientador: Ricardo Francalacci Savaris.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Elafina. 2. Hidrossalpinge. 3. ImageJ. I.  
Savaris, Ricardo Francalacci, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## AGRADECIMENTOS e DEDICATÓRIA

Agradeço

Ao professor Daniel D. Carson, do Departamento de Bioquímica e Biologia Celular da Rice University pela colaboração na análise molecular.

A Daniele G. Führich pela sua ajuda na execução do trabalho junto a patologia.

E a todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização desse trabalho que foi fruto de um esforço conjunto de uma equipe.

Em especial

*À minha família, especialmente minha esposa, Maria Rita e aos meus filhos, Antônio, João e Luiza que sempre estiveram do meu lado.*

## ÍNDICE

Abreviações:.....	1
Introdução .....	2
Revisão da Literatura .....	3
<b>Sistema Imune Inato.....</b>	<b>3</b>
<b>Elafina.....</b>	<b>4</b>
<b>Elafina em outros órgãos.....</b>	<b>8</b>
<b>O Sistema Imune Inato no trato genital feminino e a Elafina.....</b>	<b>9</b>
<b>Expressão da elafina no ciclo menstrual.....</b>	<b>12</b>
Regulação da expressão da elafina .....	12
A relação da elafina e os inibidores da protease secretada por leucócitos com os métodos anticoncepcionais.....	14
<b>Hidrossalpinge .....</b>	<b>14</b>
Referências Bibliográficas .....	16
Objetivos .....	30
Artigo Original redigido em Inglês.....	31
Artigo Original redigido em Português.....	48
Anexo 1. Figuras.....	64

**Abreviações:**

Sistema Imune Inato (SII)

Sistema Imune Adaptativo (SIA)

Proteína ácida do soro do leite (WAP - *whey acidic protein*)

Inibidores da protease secretada por leucócitos (IPSL)

Célula “Natural *Killers*” (NK)

Interleucina 8 (IL-8)

Receptores *Toll-like Receptor 4* (TLR4)

Peptídeos Antibióticos Naturais (PAN),

Precursor da elafina-ESI (PELESI)

Antileucoprotease derivada da pele (SKALP)

Lipopolissacarídeos (LPS)

$\beta$ -defensinas humanas (HBD):

Interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )

Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )

Fator de crescimento tumoral  $\beta$ 2 (TGF $\beta$ 2)

## **Introdução**

A hidrossalpinge é a evolução da salpingite tratada inadequadamente (1;2). Trata-se de um processo inflamatório crônico, que ocorre nas tubas de Falópio. Esta inflamação crônica determina mudanças estruturais e funcionais desse órgão que comprometem seriamente a fertilidade e a resposta à fertilização assistida (3). Nos casos da hidrossalpinge, o sistema de defesa está ativado. Esse sistema combate a infecção por meio do reconhecimento e da destruição do agente agressor através do processo inflamatório (4). As proteases dentre outras enzimas são um dos principais agentes nesse processo de destruição. Durante o processo inflamatório, existem vias reguladoras que servem para limitar a inflamação nos tecidos adjacentes sadios. As proteínas da família das trapinas 2, entre elas a elafina, são potentes antagonistas da ação destruidora das proteases, limitando e prevenindo a destruição incontrolada durante o processo inflamatório. Esse alarme antiprotease é localmente expresso por células epiteliais, tais como macrófagos e células T (5). A ação da elafina se faz através da ativação das células B ativadas (NF kB – *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*), por meios de ativação das citocinas ou de mecanismos de recrutamento celular.

Apesar de haver estudos referentes às vias reguladoras da limitação da inflamação nos diferentes tecidos, os mecanismos de ação das antiproteases, como a elafina, na tuba uterina ainda permanecem pouco conhecidos. Desvendar esses caminhos poderá oferecer novas estratégias terapêuticas para controlar as reações teciduais exageradas durante a reação inflamatória. Portanto, essa tese revisará a literatura sobre a participação da elafina como parte do sistema imunológico no processo inflamatório e, a seguir, fará uma análise da expressão dessa proteína e do seu RNA mensageiro nas tubas uterinas de mulheres com ou sem hidrossalpinge.

## Revisão da Literatura

### *Sistema Imune Inato*

O Sistema Imune Inato (SII) utiliza diferentes mecanismos de defesa na superfície epitelial, tais como, a alteração do pH do ambiente e a ativação dos antibióticos naturais (6). No momento em que essa primeira linha de defesa é ultrapassada por patógenos, como vírus, fungos e bactérias, ocorre a ativação dos receptores *toll-like* (6;7). Esses receptores, localizados nos tecidos, determinam a síntese e liberação dos antibióticos naturais, tais como as defensinas e as proteínas que apresentam um padrão da proteína ácida do soro do leite dos mamíferos (WAP - *whey acidic protein*) (8). Essa proteína tem domínios característicos ricos em resíduos de cisteína, chamados de 4-DSC (*4-disulphide core* - 4 centros dissulfetos). Outras proteínas, presentes principalmente na superfície das mucosas, também possuem essas características WAP DSC-4-domínios. Embora inicialmente descrita como antiproteases capazes de inibir proteases hospedeiras, em particular a elastase de neutrófilos, catepsina G e proteinase-3, e conseqüentemente à limitação da lesão tecidual durante a inflamação, tornou-se evidente que essas moléculas tinham uma variedade de outras funções como a atividade antimicrobiana direta, a opsonização de bactérias, a indução das respostas imunes adaptativas, a promoção da reparação de tecidos, entre outras atividades (7;9).

A elafina e o inibidor da protease secretada por leucócitos (IPSL) são 40% homólogos e promovem ações, tanto nos tecidos afetados, como nos tecidos adjacentes, mobilizando células com capacidade fagocítica, como os neutrófilos. Os neutrófilos representam o principal sistema de defesa celular contra as infecções. Esse sistema envolve mitoses, liberação de mediadores angiogênicos e de neovascularização, recrutamento e amadurecimento dos neutrófilos, quimiotaxia dos linfócitos T e monócitos,



células “*Natural Killers*” (NK) e macrófagos; também participam deste sistema de defesa as imunoglobulinas e ativação da cascata do complemento. Na fase aguda da infecção, os neutrófilos secretam elastases entre outras proteases. Todos esses mecanismos, além de estarem envolvidos no processo de destruição dos patógenos, são simultaneamente determinantes do processo inflamatório (10). A reação inflamatória na zona conflagrada e nos tecidos adjacentes promove lesões celulares e epiteliais consequentes da ação das proteases tais como a elastase, proteinase 3, catepsina G, metaloproteinases e cisteína (10-13). As proteases são enzimas secretadas dentro do fagossoma e possuem grande poder destruidor, sendo somente liberadas no meio extracelular, em circunstância de necessidade extrema. A elastase liberada pelos neutrófilos regula positivamente a produção de interleucina 8 (IL-8), a qual é um potente quimioatrativo dos neutrófilos. Essa regulação positiva da IL-8 pela elastase dos neutrófilos ocorre devido a ligação com o *Toll-like Receptor 4* (TLR4) na superfície das células (14). A liberação da elastase no local do processo inflamatório pode provocar uma destruição sem controle do tecido adjacente (15). Para controlar essa destruição, a elafina, o IPSL e os Peptídeos Antibióticos Naturais (PAN), com ação anti-protease, possuem papel fundamental, agindo como fatores de proteção e de controle da reação inflamatória (16;17).

### ***Elafina***

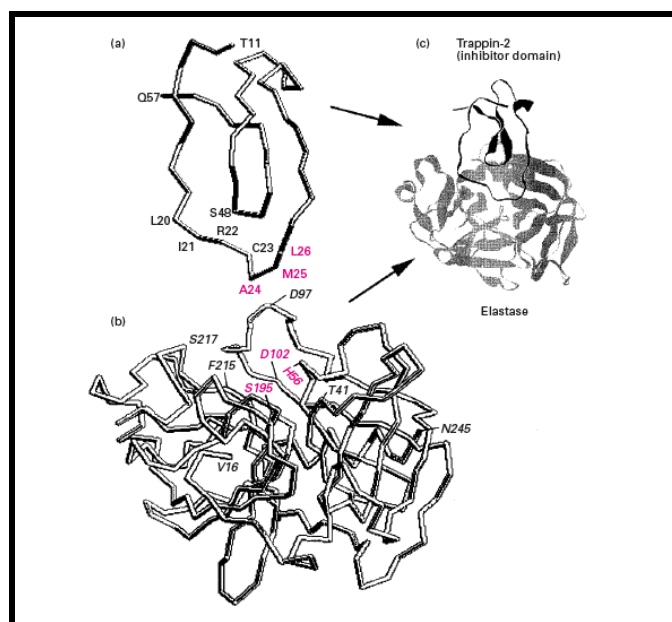
A elafina inicialmente foi considerada um agente anti-protease (18) e referida na literatura com uma variedade de nomes, entre eles, podemos citar inibidor específico de elastase, precursor da elafina-ESI (PELESI), antileucoprotease derivada da pele (SKALP) e trapina2 (19-23) ou trappin-2 (24).

A elafina pertence à família de proteínas conhecida como “*Trappin Gene Family*” (Transglutaminase ;domínio **wap**, contendo Proteína) (8). O gene da elafina se encontra no

cromossomo 20q13.12 onde contem 3 exons e 2 introns (18) e codifica uma proteína com massa molecular de 9,9 kDa, constituída de 117 aminoácidos (8). A sua ação principal é o controle da função das proteases: elastase e protease-3 (25). Outros estudos relataram as propriedades desse lipopolissacarídeo que, durante o processo inflamatório, possui uma ação antimicrobiana, a qual promove a morte dos microorganismos agressores (26;27), e, no momento da reparação tecidual, estimula a apoptose e a proliferação celular (28;29).

A elafina está presente nas mucosas e nos tecidos dos seres humanos, tanto de adultos (30), como de fetos (31;32), atuando como antiprotease de alarme (18).

A elafina apresenta dois domínios funcionais (Figura 1), um terminal carboxílico (C-terminal) com função de inibir a atividade da protease, que se dobra numa estrutura com um centro, com quatro ligações dissulfetos, ou também conhecido como domínio WAP, e um terminal amino (N-terminal) flexível, composto de múltiplas repetições de seis peptídeos: glicina, glutamina, aspartato, prolina e valina (GQDPVK), contendo uma sequência característica de valina, lisina, glicina e glutamina (VKGQ) referida como “*cementoin*” ou “*trappin*”, que promove substrato para enzima transglutaminase. Esse segundo domínio permite que a enzima interaja no ambiente extracelular e no interior dos polímeros, determinando a sua segunda ação como bactericida natural (8;28).



**Figura 1.** Interação entre a elastase e o domínio inibitório da trapina-2 (SKALP/elafina). (a) desenho da estrutura básica do domínio da trapina-2 humana (SKALP/elafina). O domínio indicado (Treonina 11 – T11; Glutamina 57 – Q57) correspondem aos resíduos 71±117 do precursor da trapina-2. Os locais de interação com a elastase são Alanina 24 (A24), metionina 25 (M25) e leucina 26 (L26) (b) elastase (c) estrutura elastase/trapina-2 [Retirado de Schalkwijk J *et al.*(8)].

Essa proteína está relacionada na interação entre o Sistema Imune Inato e o Sistema Imune Adaptativo (SIA). A ação antiprotease tem como objetivo evitar a lise celular excessiva e consequentemente destruição tecidual descontrolada, desencadeada pelas proteases durante o processo inflamatório (21;28).

Em seres humanos, foram identificados cinco tipos diferentes de trapinas, entretanto existem poucos dados sobre a real atividade destas proteínas (28).

A elafina é encontrada nos neutrófilos (localizada junto com a elastase neutrofílica) e a sua expressão no endométrio é maior no final do período secretor e durante período menstrual, sendo que, nas outras fases do ciclo menstrual, a sua expressão é ocasional (33). Existe um aumento na expressão de elafina em uma linhagem de células

epiteliais da tuba uterina (OE-E6/E7) infectadas pela *Chlamydia tracomatis* e nas tubas com gravidez ectópica (34).

Enquanto o inibidor da protease secretada por leucócito é capaz de inibir a elastase, a catepsina G, a tripsina, a triptase entre outras, a elafina possui uma ação mais restrita e específica contra a elastase e a protease 3, justificando o nome inicial recebido de inibidor específico da elastase (35).

A Tabela 1 apresenta algumas das funções da elafina, além da atividade antiprotease

**Tabela 1.** Funções conhecidas da elafina

Atividade	Referência
<b>1. Antibactericida</b>	(36-38)
<b>2. Anti-inflamatória</b>	
• Inibição do recrutamento do infiltrado inflamatório	(39;40)
• Inibição da ativação do NF-k B	(41)
<b>3. Preparo da Imunidade Inata</b>	
• Quimiotaxia dos neutrófilos	(42;43)
• Inibição da regulação negativa mediada por neutrófilos das atividades induzidas pelo C5a em outros neutrófilos.	(44)
• Aumento da resposta aos lipopolissacarídeos (LPS) <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	(42;43)
<b>4. Remodelação tecidual e diferenciação celular</b>	
• Envolvimento no desenvolvimento da glândula salivar	(32)

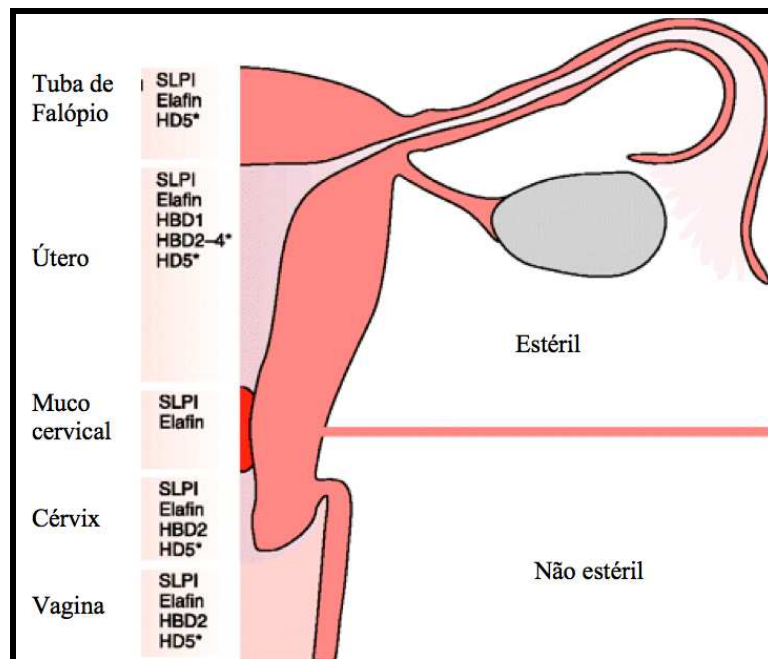
### ***Elafina em outros órgãos***

A elafina é expressa pelos neutrófilos nos diferentes tecidos, e também nas mucosas, quase sempre relacionada à ação anti-inflamatória. Esses tecidos estão sujeitos a processos inflamatórios agudos e crônicos, tais como as inflamações pulmonares crônicas (45) e ou cutâneas, como a psoríase (46). Além disso, ela também é expressa nas glândulas submandibulares (32) e em processos inflamatórios crônicos do trato gastrointestinal, como na Doença de Crohn (47).

Em modelos animais de coelhos com transplante de coração, a elafina atenua a arteriopatia coronariana e a necrose induzida pela rejeição (40).

### ***O Sistema Imune Inato no trato genital feminino e a Elafina***

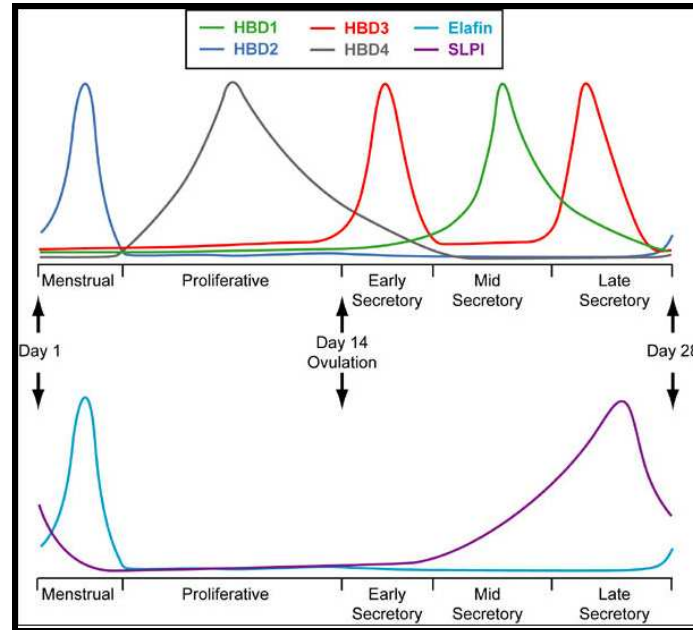
Do ponto de vista de defesa contra os patógenos, a cérvix uterina é um divisor entre dois ambientes (Figura 2). Um estéril, composto pelo endométrio, miométrio e tubas uterinas, essas últimas em contato direto com o peritônio; e um não estéril, que possui contatos com os mais diferentes agentes patogênicos comensais ou adquiridos. Esse último compreende a vagina, a cérvix e a junção escamo-colunar externa (48).



**Figura 2.** Expressão de IPSL, elafina e defensina no trato genial feminino de mulheres não grávidas. Adaptado de Horne *et al.* (48).

No sistema reprodutor feminino, foram relatados diferentes peptídeos com ação antimicrobiana. Além da elafina e do inibidor da protease secretada pelos leucócitos, encontramos as  $\alpha$ -defensinas, localizadas nos neutrófilos, as defensinas humanas, encontradas nos epitélios e as  $\beta$ -defensinas humanas (HBD): HBD1, HBD2, HBD3, HBD4

e HD5, encontradas nas superfícies epiteliais. A distribuição da expressão das  $\beta$ -defensinas 1-4 (HBD 1-4), dos inibidores das proteases secretadas pelos leucócitos e da elafina, durante o ciclo menstrual, estão representados na Figura 3 (33).



**Figura 3.** Representação do pico de expressão das  $\beta$ -defensinas HBD 1-4, Inibidor da Protease Secretada pelos Leucócitos (SLPI) e da elafina no endométrio durante o ciclo menstrual. *Proliferative*= Fase proliferativa do ciclo menstrual; *Secretory*= Fase secretora do ciclo menstrual; *Early*=inicial; *Mid*=meio; *Late*= final; *Day*=dia; *Ovulation*= dia da ovulação [Retirado de King *et al.* (33)].

Diversos estudos têm avaliado a expressão da elafina no trato genital feminino, um resumo da sua localização e a sua forma de expressão estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Expressão da elafina nos tecidos do trato genital feminino segundo dados apresentados na literatura.

Local da Expressão	Forma de expressão da elafina	Referências
Trompa de Falópio		
• não grávida/gravidez ectópica	RNA <sub>m</sub> e Proteínas	(34)
Endométrio não grávida	RNA <sub>m</sub> elevada no ciclo menstrual	(33)
Endométrio em gestação ectópica	RNA <sub>m</sub> elevado	(49)
Endométrio na presença de hidrossalpinge	Proteína	(50)
Cervix	Proteína	(51)
Vagina	Proteína	(30)
	RNA <sub>m</sub>	(52;53)
Amnion	RNA <sub>m</sub> e Proteína	(54;55)
Córion	RNA <sub>m</sub> e Proteína	(54)
Placenta	RNA <sub>m</sub> e Proteína	(54)
Decídua	RNA <sub>m</sub> e Proteína	(33;49)
Muco cervical	Proteína	(51;56)
Secreção vaginal	Proteína	(57;58)

RNA<sub>m</sub>: RNA mensageiro



### ***Expressão da elafina no ciclo menstrual***

O ciclo menstrual da mulher possui uma duração média de 28 dias é dividido em três fases, a fase folicular ou proliferativa (predomínio da secreção de estrogênio), a fase lútea ou secretora (predomínio da secreção da progesterona pelo corpo lúteo) e na menstruação. Não ocorrendo a fertilização do óvulo, os níveis de progesterona caem, determinando alterações típicas de necrose nas células endometriais, pela falta de vascularização. A menstruação por sua vez é responsável pela eliminação das células mortas do endométrio através do sangramento vaginal (59).

A expressão da elafina durante o ciclo menstrual inicia no final da fase secretora e atinge o seu ápice no período menstrual (60), conforme demonstrado na Figura 3.

King *et al.*, em 2003, demonstraram que o tratamento com progesterona em células T47D do epitélio mamário não aumenta a expressão da elafina; entretanto, o IPSL é regulado positivamente, tanto no RNAm, quanto na expressão da proteína. Essa ação é sinérgica com a adição da interleucina 1- $\beta$  e Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (61). A expressão da elafina, no final do período secretor e durante a menstruação, ocorre nos neutrófilos endometriais que são abundantes no período menstrual. Esses achados sugerem que a elafina participa no controle do processo inflamatório, onde o tecido endometrial necrótico e o sangue favorecem a proliferação bacteriana (33).

### **Regulação da expressão da elafina**

Os mediadores inflamatórios que fazem parte da primeira linha de defesa como a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) regulam positivamente a expressão da elafina (33;62). Dependendo do grau e do período de tempo, o estímulo inflamatório determina mudanças nos níveis de expressão da elafina, provocando alteração

na expressão de citocinas que irá refletir diretamente na intensidade da resposta imune (63). Portanto, o perfil inflamatório do tecido determina claramente a expressão da elafina, que por sua vez influenciará o curso da inflamação e da infecção (18).

Os tecidos com elevados níveis de neutrófilos secretores de elastase, como na pele de pacientes com psoríase, possuem uma maior expressão de elafina (64). Nos processos inflamatórios agudos como na Síndrome de Angústia Respiratória existe uma expressão maior de elafina (65).

Os processos infecciosos crônicos determinam uma diminuição na expressão de elafina nos tecidos, como por exemplo, na cérvix e na vagina de pacientes com vaginose bacteriana (51). A proteína E6 do papiloma vírus também diminui a expressão de elafina, indicando que esse mecanismo faz parte auxiliar nos instrumentos de sobrevivência do vírus (66).

As células de linhagem tumoral aumentam a expressão de elastase como parte do mecanismo de invasão e emissão de metástases, e simultaneamente reduzem a expressão de elafina (67). A elafina possui uma expressão aumentada junto às células tumorais de esôfago mais bem diferenciadas, quando comparada as pouco diferenciadas (68).

Certas metaloproteinases bacterianas, tais como as secretadas por *Pseudomonas aeruginosa*, apresentam a capacidade da fração antiprotease da elafina. Essas metaloproteinases, quando presentes *in vitro*, determinam uma expressão maior da elastase (69;70). Níveis excessivos de elastase secretada por neutrófilos, também determinam a quebra da fração carboxílica da elafina, com conseqüente perda da capacidade de inibição da elastase (71).

Por outro lado, as defensinas parecem possuir os mesmos caminhos e mecanismos de ativação e de secreção como a elafina. Embora façam parte de um outro grupo de moléculas, as defensinas desencadeiam uma maior expressão da elafina (72).

### **A relação da elafina e os inibidores da protease secretada por leucócitos com os métodos anticoncepcionais**

A superfície do endométrio não consegue agir sozinha na proteção contra a infecção. O uso de acetato de medroxiprogesterona em depósito inibe a expressão endometrial do IPSL (73), enquanto que as pílulas anticoncepcionais e o sistema intra-uterino de levonorgestrel não a inibem (74). Fleming *et al.* sugerem que a expressão das proteínas antimicrobianas deva ser avaliada nos diferentes métodos contraceptivos, sendo que os novos métodos deveriam regular positivamente a expressão dessas proteínas (74).

### ***Hidrossalpinge***

A hidrossalpinge é definida como o acúmulo de fluidos dentro da tuba de Falópio. Essa doença descreve um processo inflamatório crônico nas tubas, geralmente causado pela ascensão de organismos infecciosos, oriundos do trato genital inferior. A prevalência da hidrossalpinge varia entre 10-13% quando diagnosticada pelo ultrassom (75;76), chegando a 30% quando diagnosticado por laparoscopia (77). Sob a microscópica óptica, observa-se na hidrossalpinge uma atrofia das fibras musculares que envolvem a tuba, sendo intercalada por áreas de fibrose e edema no lúmen da tuba, ocorrendo a perda dos cílios e o acúmulo de fluidos ricos em células inflamatórias (2). A ocorrência da hidrossalpinge está relacionada aos processos inflamatórios decorrentes de Doenças Inflamatórias Pélvicas, sendo o principal agente a *Clamydia trachomatis* (1).

A hidrossalpinge é uma importante causa de infertilidade do tipo tubário. Ela também está vinculada à gênese da gravidez ectópica (78;79) e, principalmente, está associada aos insucessos, tanto das fertilizações *in vitro*, como na transferência dos

embriões (80). Os fatores tóxicos, presentes no endométrio de mulheres com hidrossalpinge, criam um ambiente inadequado e provocam a morte dos jovens embriões (81). Esses baixos índices de gravidez pós-fertilização *in vitro* ocorrem, provavelmente, devido a uma receptividade endometrial comprometida (82). Os mecanismos que interferem na fertilidade e no desenvolvimento dos embriões transplantados ainda não é bem conhecido na hidrossalpinge, mas se acredita que haja uma associação de fatores mecânicos e embriotóxicos (83). Os fatores mecânicos ocorrem pelo contra fluxo de secreções que determinam uma dificuldade na implantação dos embriões no endométrio (84). Esse fluxo de secreções na cavidade endometrial é compatível com o observado nas descargas cervicais, comuns nestes casos (85).

A IL-8 e o TNF- $\alpha$  possuem uma ação deletéria sobre o desenvolvimento e a implantação do embrião (86). O fluido da hidrossalpinge é rico em citocinas, como interleucina 2(IL-2), 8 (IL-8), IL-12. IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  e Fator de crescimento tumoral  $\beta$ 2 (TGF $\beta$ 2) (86-88). Além disso, a interleucina 2 (IL-2), produzidas por linfócitos *T-helper* tipo 1, e sabidamente prejudiciais à gravidez, foram encontradas em níveis elevados nos endométrios de mulheres com hidrossalpinge, quando comparadas com grupo controle (88).

Até o momento, apesar de estudos imuno-histoquímicos confirmarem a presença de inibidores das proteases, em diferentes regiões do trato genital feminino, são poucos os estudos existentes sobre a expressão da elafina na tuba uterina. Só existe um trabalho publicado por King *et al.* que utilizaram um modelo *in vitro* com uma linhagem de células de oviduto infectadas agudamente com *C. Trachomatis* (34). Sendo assim, um estudo nessa área é inédito na literatura e poderá agregar mais informações sobre os mecanismos inflamatórios determinantes das modificações estruturais do tecido das tubas uterinas na presença de hidrossalpinge.

## Referências Bibliográficas

1. Ajonuma LC, Ng EH, Chan HC. New insights into the mechanisms underlying hydrosalpinx fluid formation and its adverse effect on IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2002 May;8(3):255-64.
2. Ajonuma LC, Ng EH, Chan LN, Chow PH, Kung LS, Cheung AN, et al. Ultrastructural characterization of whole hydrosalpinx from infertile Chinese women. *Cell Biol Int* 2005 Oct;29(10):849-56.
3. Savaris RF, Giudice LC. The influence of hydrosalpinx on markers of endometrial receptivity. *Semin Reprod Med* 2007 Nov;25(6):476-82.
4. Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun* 2010;2(3):216-27.
5. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
6. Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 2002 Jan 15;168(2):554-61.
7. Sallenave JM. Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2: versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010 Jun;42(6):635-43.

8. Schalkwijk J, Wiedow O, Hirose S. The trappin gene family: proteins defined by an N-terminal transglutaminase substrate domain and a C-terminal four-disulphide core. *Biochem J* 1999 Jun 15;340 ( Pt 3):569-77.
9. Wilkinson TS, Roghanian A, Simpson AJ, Sallenave JM. WAP domain proteins as modulators of mucosal immunity. *Biochem Soc Trans* 2011 Oct;39(5):1409-15.
10. Pham CT. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(6-7):1317-33.
11. Owen CA, Hu Z, Lopez-Otin C, Shapiro SD. Membrane-bound matrix metalloproteinase-8 on activated polymorphonuclear cells is a potent, tissue inhibitor of metalloproteinase-resistant collagenase and serpinase. *J Immunol* 2004 Jun 15;172(12):7791-803.
12. Owen CA. Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2008;3(2):253-68.
13. Owen CA. Leukocyte cell surface proteinases: regulation of expression, functions, and mechanisms of surface localization. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(6-7):1246-72.
14. Devaney JM, Greene CM, Taggart CC, Carroll TP, O'Neill SJ, McElvaney NG. Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. *FEBS Lett* 2003 Jun 5;544(1-3):129-32.
15. Hiemstra PS, Fernie-King BA, McMichael J, Lachmann PJ, Sallenave JM. Antimicrobial peptides: mediators of innate immunity as templates for the

- development of novel anti-infective and immune therapeutics. *Curr Pharm Des* 2004;10(23):2891-905.
16. Sallenave JM, Shulmann J, Crossley J, Jordana M, Gauldie J. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994 Dec;11(6):733-41.
  17. Wiedow O, Luademann J, Utecht B. Elafin is a potent inhibitor of proteinase 3. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 Jan 15;174(1):6-10.
  18. Verrier T, Solhonne B, Sallenave JM, Garcia-Verdugo I. The WAP protein Trappin-2/Elafin: a handyman in the regulation of inflammatory and immune responses. *Int J Biochem Cell Biol* 2012 Aug;44(8):1377-80.
  19. Hochstrasser K, Albrecht GJ, Schonberger OL, Rasche B, Lempart K. An elastase-specific inhibitor from human bronchial mucus. Isolation and characterization. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1981 Oct;362(10):1369-75.
  20. Kramps JA, Klasen EC. Characterization of a low molecular weight anti-elastase isolated from human bronchial secretion. *Exp Lung Res* 1985;9(1-2):151-65.
  21. Wiedow O, Schroder JM, Gregory H, Young JA, Christophers E. Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1990 Sep 5;265(25):14791-5.
  22. Saheki T, Ito F, Hagiwara H, Saito Y, Kuroki J, Tachibana S, et al. Primary structure of the human elafin precursor preproelafin deduced from the nucleotide

- sequence of its gene and the presence of unique repetitive sequences in the prosegment. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 May 29;185(1):240-5.
23. Sallenave JM, Ryle AP. Purification and characterization of elastase-specific inhibitor. Sequence homology with mucus proteinase inhibitor. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1991 Jan;372(1):13-21.
  24. Jaovisidha K, Etim A, Yamakawa K, Masuda I, Gohr CM, Wakim BT, et al. The serine protease inhibitor trappin-2 is present in cartilage and synovial fluid in osteoarthritis. *J Rheumatol* 2006 Feb;33(2):318-25.
  25. Scott A, Weldon S, Taggart CC. SLPI and elafin: multifunctional antiproteases of the WFDC family. *Biochem Soc Trans* 2011 Oct;39(5):1437-40.
  26. Sallenave JM. Antimicrobial activity of antiproteinases. *Biochem Soc Trans* 2002 Apr;30(2):111-5.
  27. Fitch PM, Roghanian A, Howie SE, Sallenave JM. Human neutrophil elastase inhibitors in innate and adaptive immunity. *Biochem Soc Trans* 2006 Apr;34(Pt 2):279-82.
  28. Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM. SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin Sci (Lond)* 2006 Jan;110(1):21-35.
  29. Shaw L, Wiedow O. Therapeutic potential of human elafin. *Biochem Soc Trans* 2011 Oct;39(5):1450-4.



30. Pfundt R, van RF, van Vlijmen-Willems IM, Alkemade HA, Zeeuwen PL, Jap PH, et al. Constitutive and inducible expression of SKALP/elafin provides anti-elastase defense in human epithelia. *J Clin Invest* 1996 Sep 15;98(6):1389-99.
31. Helmig R, Uldbjerg N, Ohlsson K. Secretory leukocyte protease inhibitor in the cervical mucus and in the fetal membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995 Mar;59(1):95-101.
32. Lee SK, Lee SS, Hirose S, Park SC, Chi JG, Chung SI, et al. Elafin expression in human fetal and adult submandibular glands. *Histochem Cell Biol* 2002 May;117(5):423-30.
33. King AE, Critchley HO, Sallenave JM, Kelly RW. Elafin in human endometrium: an antiprotease and antimicrobial molecule expressed during menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 Sep;88(9):4426-31.
34. King AE, Wheelhouse N, Cameron S, McDonald SE, Lee KF, Entrican G, et al. Expression of secretory leukocyte protease inhibitor and elafin in human fallopian tube and in an in-vitro model of *Chlamydia trachomatis* infection. *Hum Reprod* 2009 Mar;24(3):679-86.
35. Sallenave JM, Marsden MD, Ryle AP. Isolation of elafin and elastase-specific inhibitor (ESI) from bronchial secretions. Evidence of sequence homology and immunological cross-reactivity. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1992 Jan;373(1):27-33.

36. Simpson AJ, Maxwell AI, Govan JR, Haslett C, Sallenave JM. Elafin (elastase-specific inhibitor) has anti-microbial activity against gram-positive and gram-negative respiratory pathogens. *FEBS Lett* 1999 Jun 11;452(3):309-13.
37. Wiedow O, Harder J, Bartels J, Streit V, Christophers E. Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 Jul 30;248(3):904-9.
38. McMichael JW, Maxwell AI, Hayashi K, Taylor K, Wallace WA, Govan JR, et al. Antimicrobial activity of murine lung cells against *Staphylococcus aureus* is increased in vitro and in vivo after elafin gene transfer. *Infect Immun* 2005 Jun;73(6):3609-17.
39. Vachon E, Bourbonnais Y, Bingle CD, Rowe SJ, Janelle MF, Tremblay GM. Anti-inflammatory effect of pre-elafin in lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation. *Biol Chem* 2002 Jul;383(7-8):1249-56.
40. Cowan B, Baron O, Crack J, Coulber C, Wilson GJ, Rabinovitch M. Elafin, a serine elastase inhibitor, attenuates post-cardiac transplant coronary arteriopathy and reduces myocardial necrosis in rabbits after heterotopic cardiac transplantation. *J Clin Invest* 1996 Jun 1;97(11):2452-68.
41. Henriksen PA, Hitt M, Xing Z, Wang J, Haslett C, Riemersma RA, et al. Adenoviral gene delivery of elafin and secretory leukocyte protease inhibitor attenuates NF-kappa B-dependent inflammatory responses of human endothelial cells and macrophages to atherogenic stimuli. *J Immunol* 2004 Apr 1;172(7):4535-44.

42. Simpson AJ, Cunningham GA, Porteous DJ, Haslett C, Sallenave JM. Regulation of adenovirus-mediated elafin transgene expression by bacterial lipopolysaccharide. *Hum Gene Ther* 2001 Jul 20;12(11):1395-406.
43. Sallenave JM, Cunningham GA, James RM, McLachlan G, Haslett C. Regulation of pulmonary and systemic bacterial lipopolysaccharide responses in transgenic mice expressing human elafin. *Infect Immun* 2003 Jul;71(7):3766-74.
44. Tralau T, Meyer-Hoffert U, Schroder JM, Wiedow O. Human leukocyte elastase and cathepsin G are specific inhibitors of C5a-dependent neutrophil enzyme release and chemotaxis. *Exp Dermatol* 2004 May;13(5):316-25.
45. Griese M, Pudenz P, Gebhard W. Inhibitors of elastase in airway lavage samples from ventilated preterm human neonates. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 Jul;158(1):256-62.
46. Tanaka N, Fujioka A, Tajima S, Ishibashi A, Hirose S. Levels of proelafin peptides in the sera of the patients with generalized pustular psoriasis and pustulosis palmoplantaris. *Acta Derm Venereol* 2000 Mar;80(2):102-5.
47. Schmid M, Fellermann K, Fritz P, Wiedow O, Stange EF, Wehkamp J. Attenuated induction of epithelial and leukocyte serine antiproteases elafin and secretory leukocyte protease inhibitor in Crohn's disease. *J Leukoc Biol* 2007 Apr;81(4):907-15.
48. Horne AW, Stock SJ, King AE. Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. *Reproduction* 2008 Jun;135(6):739-49.

49. Dalgetty DM, Sallenave JM, Critchley HO, Williams AR, Tham WY, King AE, et al. Altered secretory leukocyte protease inhibitor expression in the uterine decidua of tubal compared with intrauterine pregnancy. *Hum Reprod* 2008 Jul;23(7):1485-90.
50. Guedes Neto EP, Edelweiss MI, de Moraes GS, Cristovam RA, Savaris RF. The influence of hydrosalpinx on endometrial elafin expression. *Fertil Steril* 2011 Jun 30;95(8):2673-5.
51. Stock SJ, Duthie L, Tremaine T, Calder AA, Kelly RW, Riley SC. Elafin (SKALP/Trappin-2/proteinase inhibitor-3) is produced by the cervix in pregnancy and cervicovaginal levels are diminished in bacterial vaginosis. *Reprod Sci* 2009 Dec;16(12):1125-34.
52. Narvekar N, Lakha F, Critchley HO, Glasier AF, Williams AR, Leminien R, et al. Changes in vaginal morphology, steroid receptor and natural antimicrobial content following treatment with low-dose mifepristone. *Contraception* 2007 Apr;75(4):271-80.
53. Chen B, Wen Y, Zhang Z, Guo Y, Warrington JA, Polan ML. Microarray analysis of differentially expressed genes in vaginal tissues from women with stress urinary incontinence compared with asymptomatic women. *Hum Reprod* 2006 Jan;21(1):22-9.
54. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JR. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. *Placenta* 2007 Feb;28(2-3):161-9.

55. Stock SJ, Kelly RW, Riley SC, Calder AA. Natural antimicrobial production by the amnion. *Am J Obstet Gynecol* 2007 Mar;196(3):255-6.
56. Kyongo JK, Jespers V, Goovaerts O, Michiels J, Menten J, Fichorova RN, et al. Searching for lower female genital tract soluble and cellular biomarkers: defining levels and predictors in a cohort of healthy Caucasian women. *PLoS ONE* 2012;7(8):e43951.
57. Patel MV, Fahey JV, Rossoll RM, Wira CR. Innate Immunity in the Vagina (Part I): Estradiol Inhibits HBD2 and Elafin Secretion by Human Vaginal Epithelial Cells. *Am J Reprod Immunol* 2013 Feb 8.
58. Ghosh M, Fahey JV, Shen Z, Lahey T, Cu-Uvin S, Wu Z, et al. Anti-HIV activity in cervical-vaginal secretions from HIV-positive and -negative women correlate with innate antimicrobial levels and IgG antibodies. *PLoS ONE* 2010;5(6):e11366.
59. Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Chapter 15. Reproductive endocrinology. In: Schorge JO, chaffer JI, alvorson LM, offman BL, radshaw KD, unningham FG, eds. *Williams Gynecology*. 1 ed. McGraw-Hill Co.; 2008.
60. King AE, Critchley HO, Kelly RW. Innate immune defences in the human endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2003 Nov 28;1:116.
61. King AE, Morgan K, Sallenave JM, Kelly RW. Differential regulation of secretory leukocyte protease inhibitor and elafin by progesterone. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 Oct 17;310(2):594-9.

62. Tanaka N, Fujioka A, Tajima S, Ishibashi A, Hirose S. Elafin is induced in epidermis in skin disorders with dermal neutrophilic infiltration: interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha stimulate its secretion in vitro. *Br J Dermatol* 2000 Oct;143(4):728-32.
63. McMichael JW, Roghanian A, Jiang L, Ramage R, Sallenave JM. The antimicrobial antiproteinase elafin binds to lipopolysaccharide and modulates macrophage responses. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005 May;32(5):443-52.
64. Schalkwijk J, van V, I, Alkemade JA, de Jongh GJ. Immunohistochemical localization of SKALP/elafin in psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol* 1993 Apr;100(4):390-3.
65. Sallenave JM, Donnelly SC, Grant IS, Robertson C, Gauldie J, Haslett C. Secretory leukocyte proteinase inhibitor is preferentially increased in patients with acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J* 1999 May;13(5):1029-36.
66. Duffy CL, Phillips SL, Klingelutz AJ. Microarray analysis identifies differentiation-associated genes regulated by human papillomavirus type 16 E6. *Virology* 2003 Sep 15;314(1):196-205.
67. Yokota T, Bui T, Liu Y, Yi M, Hunt KK, Keyomarsi K. Differential regulation of elafin in normal and tumor-derived mammary epithelial cells is mediated by CCAAT/enhancer binding protein beta. *Cancer Res* 2007 Dec 1;67(23):11272-83.

68. Yamamoto S, Egami H, Kurizaki T, Ohmachi H, Hayashi N, Okino T, et al. Immunohistochemical expression of SKALP/elafin in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br J Cancer* 1997;76(8):1081-6.
69. Guyot N, Bergsson G, Butler MW, Greene CM, Weldon S, Kessler E, et al. Functional study of elafin cleaved by *Pseudomonas aeruginosa* metalloproteinases. *Biol Chem* 2010 Jun;391(6):705-16.
70. Taggart CC, Lowe GJ, Greene CM, Mulgrew AT, O'Neill SJ, Levine RL, et al. Cathepsin B, L, and S cleave and inactivate secretory leucoprotease inhibitor. *J Biol Chem* 2001 Sep 7;276(36):33345-52.
71. Guyot N, Butler MW, McNally P, Weldon S, Greene CM, Levine RL, et al. Elafin, an elastase-specific inhibitor, is cleaved by its cognate enzyme neutrophil elastase in sputum from individuals with cystic fibrosis. *J Biol Chem* 2008 Nov 21;283(47):32377-85.
72. van WS, van der Linden AC, van Sterkenburg MA, de Boer WI, Kuijpers AL, Schalkwijk J, et al. Regulation of SLPI and elafin release from bronchial epithelial cells by neutrophil defensins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000 Jan;278(1):L51-L58.
73. Li A, Felix JC, Yang W, Jain JK. Effect of mifepristone on the expression of endometrial secretory leukocyte protease inhibitor in new medroxyprogesterone acetate users. *Fertil Steril* 2008 Sep;90(3):872-5.

74. Fleming DC, King AE, Williams AR, Critchley HO, Kelly RW. Hormonal contraception can suppress natural antimicrobial gene transcription in human endometrium. *Fertil Steril* 2003 Apr;79(4):856-63.
75. Andersen AN, Yue Z, Meng FJ, Petersen K. Low implantation rate after in-vitro fertilization in patients with hydrosalpinges diagnosed by ultrasonography. *Hum Reprod* 1994 Oct;9(10):1935-8.
76. Katz E, Akman MA, Damewood MD, Garcia JE. Deleterious effect of the presence of hydrosalpinx on implantation and pregnancy rates with in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996 Jul;66(1):122-5.
77. Broeze KA, Opmeer BC, Van GN, Coppus SF, Collins JA, Den Hartog JE, et al. Are patient characteristics associated with the accuracy of hysterosalpingography in diagnosing tubal pathology? An individual patient data meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2010 Dec 8.
78. Faro S. Chlamydia trachomatis: female pelvic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991 Jun;164(6 Pt 2):1767-70.
79. Shaw JL, Wills GS, Lee KF, Horner PJ, McClure MO, Abrahams VM, et al. Chlamydia trachomatis infection increases fallopian tube PROKR2 via TLR2 and NFkappaB activation resulting in a microenvironment predisposed to ectopic pregnancy. *Am J Pathol* 2011 Jan;178(1):253-60.



80. Strandell A, Lindhard A, Waldenstrom U, Thorburn J. Hydrosalpinx and IVF outcome: cumulative results after salpingectomy in a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2001 Nov;16(11):2403-10.
81. Barmat LI, Rauch E, Spandorfer S, Kowalik A, Sills ES, Schattman G, et al. The effect of hydrosalpinges on IVF-ET outcome. *J Assist Reprod Genet* 1999 Aug;16(7):350-4.
82. Meyer WR, Castelbaum AJ, Somkuti S, Sagoskin AW, Doyle M, Harris JE, et al. Hydrosalpinges adversely affect markers of endometrial receptivity. *Hum Reprod* 1997 Jul;12(7):1393-8.
83. Strandell A, Lindhard A. Why does hydrosalpinx reduce fertility? The importance of hydrosalpinx fluid. *Hum Reprod* 2002 May;17(5):1141-5.
84. Eytan O, Azem F, Gull I, Wolman I, Elad D, Jaffa AJ. The mechanism of hydrosalpinx in embryo implantation. *Hum Reprod* 2001 Dec;16(12):2662-7.
85. Watermeyer SR, Bhal K. Chronic vaginal discharge secondary to a hydrosalpinx. *J Obstet Gynaecol* 2002 May;22(3):324.
86. Strandell A, Thorburn J, Wallin A. The presence of cytokines and growth factors in hydrosalpingeal fluid. *J Assist Reprod Genet* 2004 Jul;21(7):241-7.
87. Sung L, Copperman A, Goldstein M, Lapinski R, Bustillo M, Murkherjee T. Characterization of cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, and TNF $\alpha$ ) in human hydrosalpinx fluid: a potential mechanism for embryo toxicity. *Fertil Steril* 1997;68:S78.

88. Copperman AB, Wells V, Luna M, Kalir T, Sandler B, Mukherjee T. Presence of hydrosalpinx correlated to endometrial inflammatory response in vivo. *Fertil Steril* 2006 Oct;86(4):972-6.

## **Objetivos**

1. Determinar a expressão proteica da elafina, através da técnica de imunohistoquímica, nas tubas uterinas de mulheres com e sem hidrossalpinge.
2. Quantificar a expressão do RNAm da elafina, através da técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real nas tubas uterinas de mulheres com e sem hidrossalpinge.

Artigo Original redigido em Inglês

## Elafin Expression in Mucosa of Fallopian Tubes Is Altered by Hydrosalpinx

1. E. P. Guedes Neto, MD, MSc, PhD<sup>1</sup>
2. D. G. Fuhrich, BS<sup>2</sup>
3. D. D. Carson, PhD<sup>3,4</sup>
4. B. J. Engel, BS<sup>3</sup>
5. R. F. Savaris, MD, MSc, PhD<sup>1,2</sup>↑

1. <sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
2. <sup>2</sup>Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
3. <sup>3</sup>Department of Biochemistry and Cell Biology, Wiess School of Natural Sciences Rice University, Houston, TX, USA
4. <sup>4</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA

1. R. F. Savaris, Serviço de Ginecologia e Obstetrícia – HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350/1125, Porto Alegre, RS 90035-903, Brazil.  
Email: [rsavaris@hcpa.ufrgs.br](mailto:rsavaris@hcpa.ufrgs.br)

### Abstract

Elafin is a natural antimicrobial molecule and a member of the antileukoproteinase (Trappin) family. It is normally expressed in the mucosae of fallopian tubes. Hydrosalpinx is a chronic inflammatory process of the fallopian tubes. The objective of this study is to compare the localization of elafin protein and levels of elafin messenger RNA (mRNA) in the mucosa of oviducts with and without hydrosalpinx. Immunohistochemical analysis was performed on tissue sections of hydrosalpinx (n = 10) and normal tubes (n = 22) from paraffin-embedded blocks, obtained from patients who underwent salpingectomy for benign conditions. The main outcome measure was the intensity of staining with 3,3'-diaminobenzidine calculated by ImageJ software and

mRNA expression by real-time polymerase chain reaction. The mean intensity of elafin (mean  $\pm$  standard deviation) in mucosae of the fallopian tubes was 69.68  $\pm$  24.55 in controls and 32.03 $\pm$ 18.16 in patients with hydrosalpinx ( $P < .0001$ ). Elafin mRNA levels were reduced in hydrosalpinx, although not significantly ( $P = .05$ ,  $n = 9$  from each group). Therefore, tubal epithelium of women with hydrosalpinx seems to have a lower expression of elafin, an elastase inhibitor and a natural antimicrobial molecule, compared to normal tubes.

## Introduction

Elafin is a natural antimicrobial molecule and a member of the antileukoproteinase (Trappin) family, also called Trappin-2.<sup>1,2</sup> Its expression has been reported in both the oral cavity<sup>3</sup> and the female reproductive tract epithelium.<sup>4</sup> Elafin expression in endometrium occurs only during menses.<sup>4</sup> However, in mucosae of fallopian tubes, its expression is constant throughout the menstrual cycle.<sup>5</sup> Inside the gravid uterus, elafin is released by the decidua, fetal membranes, and lungs, and it is responsible for the regulation of proinflammatory paracrine interactions to maintain the pregnancy and to limit uterine infections.<sup>6</sup> Its function is likely to be involved in the innate mucosal defenses that prevent uterine infection, and the antiproteolytic mechanisms that regulate menstruation and aid tissue repair.<sup>7</sup> Women with bacterial vaginosis have a lower level of elafin in their cervicovaginal secretions.<sup>8</sup> Hydrosalpinx, a chronic inflammatory process of the fallopian tubes that is usually an end result of pelvic inflammatory disease, is a well-known risk factor for ectopic pregnancy, infertility, and low success of in vitro fertilization (IVF).<sup>9,10</sup>

Metalloproteinases (MMPs) are key molecules related to tissue degradation, and they are a common finding in hydrosalpinx.<sup>11</sup> In addition, hydrosalpinx fluid is rich in tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), a proinflammatory cytokine that increases elafin messenger RNA (mRNA) expression.<sup>12</sup> Furthermore, hydrosalpinx fluid stimulates the total gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9.<sup>11</sup> Neutrophil elastase activates MMP-2, -3, and -9 and degrades tissue inhibitors of the MMPs (TIMP-1 and TIMP-2).<sup>13</sup> In contrast, elafin inhibits neutrophil elastase and proteinase 3,<sup>14</sup> whereas elastase inhibits elafin.<sup>15</sup>

Our group has shown that, in the presence of hydrosalpinx, endometrial elafin expression is reduced most likely as a result of consumption.<sup>16</sup> Although there are indirect data suggesting that elafin would be enhanced in the hydrosalpinx epithelial mucosa secondary to the high concentration of TNF- $\alpha$  in the hydrosalpinx fluid,<sup>12</sup> there is also indirect data suggesting that elafin expression would be diminished, because epithelial mucosa of the fallopian tube is degraded.<sup>11</sup> So far, there are no studies reporting the immunohistochemical expression of elafin in the tubal epithelium of women with hydrosalpinx (PubMed search: elafin and hydrosalpinx, no limits, from 1966 until April 2013). The closest article related to infection in oviducts was published by King et al. These authors measured the mRNA expression of elafin in an in vitro model using oviduct cell line acutely infected with *Chlamydia trachomatis*.<sup>5</sup> Hydrosalpinx is a chronic condition, while the in vitro model, reported by King et al, represents an acute salpingitis model. If the expression of elafin is reduced in the mucosa of patients with hydrosalpinx, this information may explain why there is an increased risk for the development of pelvic inflammatory disease in patients who had a previous sexually transmitted disease.<sup>17</sup> Understanding the mechanisms involved in hydrosalpinx formation may be the basis for future research investigating new treatments to restore or maintain the reproductive capabilities of patients. Therefore, the aim of this study was to compare the expression of elafin in the tubal epithelium of women with and without hydrosalpinx.

## Material and methods

For this case–control study, formalin–fixed, paraffin-embedded tissues were obtained from the archives of the Pathology Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, from 2010 and 2011. An experienced pathologist reviewed the slides and confirmed the diagnosis of hydrosalpinx and normal tubes. Normal and hydrosalpinx tubes were

obtained from total hysterectomy specimens for benign conditions (leiomyomas and dysfunctional uterine bleeding). Patients with cancer and acute salpingitis were excluded.

### **Immunohistochemistry**

Immunohistochemical staining was performed as reported previously,<sup>16</sup> using the primary antibody against elafin (HM2063-0603; Hycult Biotechnology, Udem, The Netherlands) diluted to a ratio 1:10. The negative external controls were obtained by carrying out immunostaining without the primary antibody. Tonsil tissue was used as positive external controls. Stained sections were analyzed with an Olympus BX51 microscope (Olympus Optical Co, Tokyo, Japan) connected to a digital color camera/Q-Color 5 (Olympus). The slide was evaluated using multiple digital pictures, 1 microscopic field = 1 picture. Images were obtained with a 4× objective UPLanFI (resolution: 2.75 µm) at a size of 2560 × 1920 pixels (resolution: 1 mm = 590 pixels) under standard lighting conditions.

### **ImageJ Analyses**

In order to reduce bias, each slide was coded and blindly analyzed with the image analysis software ImageJ (ImageJ v1.43j; National Institutes of Health, Bethesda, MD, available at <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The whole cross-section with luminal epithelium was used as the desired area to be analyzed in the normal fallopian tube. In fallopian tubes with hydrosalpinx, all luminal epithelium presented in the slide was selected. After selecting the desired area to be analyzed, the selected image was submitted to the analytical procedure “color deconvolution” written as built-in “plugin” for ImageJ, using the hematoxylin and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) built-in vector (HDAB).<sup>18</sup> This built-in HDAB vector separates the digital image ([Figure 1A](#)) into 3 different panels, one with hematoxylin, a second panel with DAB only, and a third panel with



background ([Figure 1B](#) and C). Of the 3 images obtained from “color deconvolution,” the hematoxylin-only picture was selected and converted into a binary picture. A “mask” was created to identify the region of interest (ROI manager), and it was saved in a file. The picture with DAB intensity was selected, and the “mask” was overlaid on the image ([Figure 1E](#)). The DAB staining intensity and the total area were measured by the software, yielding the mean intensity of the DAB immunostaining from the ROI. When multiple pictures were taken from the same specimen, the average intensity of DAB was calculated. The final DAB intensity was calculated according to the formula:  $f = 255 - i$ , where  $f$  = final DAB intensity and  $i$  = mean DAB intensity obtained from the software. The final DAB intensity varied from 0 (white, no expression) to 255 (dark brown, highest expression).

### **RNA Isolation and Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis**

Total RNA was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded fallopian tissue using the High Pure FFPE RNA Micro Kit (Roche, Indianapolis, Indiana) per manufacturer’s instructions from 10 samples of each group. RNA concentration was measured using NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware). Reverse transcription was performed using the Omniscript RT Kit (Qiagen, Valencia, California) per manufacturer’s instructions. Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using the elafin primer sequences elafin forward 5'-TGGCTCCTGCCCCATTATC-3' and reverse 5'-CAGTATCTTTCAAGCAGCGGTTAG-3',  $\beta$ -actin forward 5'-GATGAGATTGGCATGGCTTT-3' and reverse 5'-CACCTTCACCGGTCCAGTTT-3', and SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, California). Samples were cycled for 15 seconds at 95°C, 1 minute at 60°C (elafin) and 30 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C ( $\beta$ -actin) on a C1000 Thermocycler with CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, California).

The levels of elafin mRNA were identified using the comparative threshold cycle method by ABI Prism 7000 SDS software (User Bulletin No. 2, ABI Prism 7700 Sequence Detection System; Applied Biosystems) normalizing to  $\beta$ -actin.

### **Ethics, Sample Size Calculation, and Statistical Analysis**

The local ethics committee, Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, approved the study (number 11-0238). The ethics committee decided to waive written informed consent from patients, because samples were obtained from pathology archives. However, the authors of the study signed a statement to preserve the privacy of the patients, and all data were used exclusively for this study. Sample size for immunohistochemical analysis was calculated according to the formula  $n = [(z\alpha + z\beta)^2 \cdot 2 \cdot (s)^2]/(d)^2$ , as described<sup>19</sup> using the following parameters: an  $\alpha$  error ( $z\alpha$ ) = .05, a power ( $z\beta$ ) = .8, an estimate standard deviation (SD) of elafin of 18, thus variance  $(s)^2 = 324$ , and a difference (d) of 25 points to be found in a scale ranging from 0 to 255 (ie, a difference of 10%). The variance was obtained from a pilot study with 19 cases of normal tubes. These figures yielded a sample size of at least 8 cases in each group.

GraphPad Prism version 5 for Macintosh (GraphPad Software, Inc, San Diego, California) was performed for statistical analysis, using unpaired Student t test with Welch correction to compare the expression of elafin (final DAB intensity) in tubal epithelium of the 2 groups if data had a Gaussian distribution; otherwise, Mann-Whitney test was used. For nonparametric data, Fisher exact test was used. Mann-Whitney test was used for statistical analysis of RT-PCR results, comparing median values of each group as individual data points using  $2^{-\Delta Ct}$  and considering a *P* value <.05 as significant.<sup>20</sup>

## Results

A total of 32 samples were obtained (10 hydrosalpinges; 22 controls). No significant differences were found between the groups when age, ethnicity, and parity were analyzed. There was no significant correlation between age of the patient and elafin expression by immunostaining ( $r^2 = .05$ ,  $P = .3$ —correlation coefficient ( $r$ ) =  $-.2$ , 95% confidence interval =  $-0.6$  to  $0.2$ —data not shown). Further characteristics of the samples are depicted in [Table 1](#). All values for DAB intensity and RT-PCR passed in the Kolmogorov-Smirnov normality test, and unpaired  $t$  test with Welch correction was used when mean  $\pm$  SD was presented.

### ***Immunohistochemistry***

Positive external control for elafin stained strongly with DAB ([Figure 2A-n](#)). Elafin expression was consistently uniform across isthmic and ampullary segments of the fallopian tubes (data not shown). [Figure 2A](#) (a-f) depicts the normal tissue sections of 6 different fallopian tubes with positive elafin expression (dark brown). Elafin is localized in the cytoplasm and in some cases inside the nucleus of the epithelial part of the mucosa. Hydrosalpinx sections had lower or no elafin expression ([Figure 2A \[g-l\]](#)). The mean intensity of elafin (mean  $\pm$  SD) in mucosae of the fallopian tubes was  $69.68 \pm 24.55$  in controls and  $32.03 \pm 18.16$  in patients with hydrosalpinx (unpaired  $t$  test with Welch correction  $P < .0001$ —[Figure 2B](#)).

### ***Real-time PCR analysis***

From the 10 samples randomly chosen in each group, only 9 samples were used for quantitative RT-PCR analysis to determinate the potential changes in elafin mRNA levels in the samples. One sample did not yield enough RNA, and the other had degraded RNA. Although mean values ( $\pm$ SD) of the percentage of elafin mRNA/ $\beta$ -actin

mRNA expression in hydrosalpinx ( $0.04 \pm 0.02$ ) were reduced compared to control groups ( $0.08 \pm 0.05$ ), this difference was not significant ( $P = .05$ ), as shown in [Figure 3](#).

## Discussion

The data presented here demonstrate that elafin protein expression is reduced on the mucosal epithelium of oviducts with hydrosalpinx, and mRNA levels had a 2-fold change compared to hydrosalpinx, but they were not significantly different ( $P = .05$ ). We were not able to retrieve any data of this patient, except for our own previous report.[16](#) Therefore, the possible explanations for our findings could be explained through indirect evidences. The low expression of tissue-associated elafin protein in hydrosalpinx could be related to its reduced production and/or increased secretion and degradation. Jastrow et al, using an in vitro model, reported that hydrosalpinx fluid stimulates the total gelatinolytic activity of cytotrophoblastic cells through the activity of MMP-2 and MMP-9, which were not counteracted by their inhibitors, that is, TIMP-1 and elafin.[11](#) Copperman et al found that there is a significant increase in the number of neutrophils in hydrosalpinx tissue.[21](#) Lee et al using a mice model showed that hydrosalpinx formation is related to increased production of *MMP-9*.[22](#) Guyot et al have shown that in the presence of excess neutrophil elastase, elafin is cleaved.[15](#) From these data, we can infer that increased elastase concentrations derived from neutrophils result in increased elafin protein degradation and, therefore, may be responsible for low levels of elafin in immunohistochemistry analysis.

King et al, using an in vitro model of OE-E6/E7 oviductal epithelial cell line infected with *C. trachomatis*, demonstrated that mRNA elafin levels were increased during acute infection.[5](#) This in vitro study reflects an acute condition and may differ from responses observed in the chronic condition of hydrosalpinx. In some chronic

conditions, such as chronic sinusitis, elafin is highly expressed in mucosa,<sup>23</sup> but in others, such as chronic obstructive pulmonary disease, viral infections with secondary bacterial infections reduce elafin expression.<sup>24</sup> These observations indicate that regulation of both expression and elafin catabolism is complex and possibly tissue specific. Although no statistical significance was observed, mean values of mRNA from normal fallopian tubes is higher than from hydrosalpinx group, as shown in [Figure 3](#). One possible explanation for not finding a significant difference between the groups could be related to the fact the whole paraffin-embedded tissue was used for mRNA analysis, while in ImageJ, we were able to select only the mucosa of the oviduct. A laser capture analysis would overcome this problem and could be used in future work. One positive aspect of this study was the use of the ImageJ software to quantify DAB intensity for elafin staining. The only human factor related to this quantification was the selection of the image. The consistency obtained with image software is in accordance with Helps et al who used ImageJ for DAB expression in brain tissue.<sup>25</sup> The ImageJ method was used instead of other semiquantitative methods, because we were not able to obtain consistently low inter- and intravariability of the results. The use of ImageJ software eliminated this problem. Another positive aspect of the study was sample size calculation (power analysis). Despite the relative small sample size, we demonstrated that with the present sample size, power analysis was adequate. Increasing the difference in DAB intensity would actually reduce the sample size according to the formula given in Materials and Methods section. Nevertheless, there are few limitations in the study which should be addressed. No mechanistic study was made to explain why elafin immunostaining was decreased in hydrosalpinx, but this was not the objective of the study. We did not have data related to previous sexually transmitted disease from patients with hydrosalpinx or

identification of *C. trachomatis*. Parity between the groups was not significantly different, even in the presence of hydrosalpinx, a known infertility factor. It is possible that these conditions could be started later in their live, since the mean age of both the groups was between 45 and 47 years.

In conclusion, we found that tissue-associated elafin protein expression is reduced in the mucosa lining the oviducts with hydrosalpinx compared to normal fallopian tubes. This reduction was suggested by reduced mRNA levels, although no statistical difference was found.

The potential clinical relevance of these findings can be related to the fact that elafin is an antibacterial adjuvant in mucosal defense and an antiprotease. If elafin is a clinically useful antimicrobial and antiprotease molecule, it might be used as an adjuvant in pelvic inflammatory disease to reduce damage of the fallopian tubes or as new adjuvant therapy for assisted reproductive technologies in those patients with hydrosalpinx that are candidates for in vitro fertilization. Regulation of elafin in acute and chronic inflammatory process of fallopian tubes is an area that needs further investigation.

- **Declaration of Conflicting Interests** The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

- **Funding** The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by Fundação de Incentivo a Pesquisa e Ensino (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, grant 11-0238.

## Notes

---

- **Authors' Note** This Work was carried out at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Wiess School of Natural Sciences, Rice University, Houston, TX, USA.

## References

1. Baranger K, Zani ML, Chandener J, Dallet-Choisy S, Moreau T. The antibacterial and antifungal properties of trappin-2 (pre-elafin) do not depend on its protease inhibitory function. *FEBS J* 2008; 275:2008-2020.
2. Moreau T, Baranger K, Dade S, Dallet-Choisy S, Guyot N, Zani ML. Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family. *Biochimie* 2008; 90:284-295.
3. Shugars DC. Endogenous mucosal antiviral factors of the oral cavity. *J Infect Dis* 1999; 179 Suppl 3:S431-5.
4. King AE, Critchley HO, Kelly RW. Innate immune defences in the human endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:116.
5. King AE, Wheelhouse N, Cameron S, McDonald SE, Lee KF, Entrican G, Critchley HO, Horne AW. Expression of secretory leukocyte protease inhibitor and elafin in human fallopian tube and in an in-vitro model of *Chlamydia trachomatis* infection. *Hum Reprod* 2009; 24:679-686.
6. Simmen RC, Michel FJ, Fliss AE, Smith LC, Fliss MF. Ontogeny, immunocytochemical localization, and biochemical properties of the pregnancy-associated uterine elastase/cathepsin-G protease inhibitor, antileukoproteinase (ALP): monospecific antibodies to a synthetic peptide recognize native ALP. *Endocrinology* 1992; 130:1957-1965.

7. King AE, Critchley HO, Sallenave JM, Kelly RW. Elafin in human endometrium: an antiprotease and antimicrobial molecule expressed during menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4426-4431.
8. Stock SJ, Duthie L, Tremaine T, Calder AA, Kelly RW, Riley SC. Elafin (SKALP/Trappin-2/proteinase inhibitor-3) is produced by the cervix in pregnancy and cervicovaginal levels are diminished in bacterial vaginosis. *Reprod Sci* 2009; 16:1125-1134.
9. Savaris RF, Giudice LC. The influence of hydrosalpinx on markers of endometrial receptivity. *Semin Reprod Med* 2007; 25:476-482.
10. Strandell A, Lindhard A, Waldenstrom U, Thorburn J, Janson PO, Hamberger L. Hydrosalpinx and IVF outcome: a prospective, randomized multicentre trial in Scandinavia on salpingectomy prior to IVF. *Hum Reprod* 1999; 14:2762-2769.
11. Jastrow N, Chardonens D, Araman M, Meisser A, Campana A, Bischof P. Effect of hydrosalpinx fluid on secretion of trophoblastic matrix metalloproteinases. *Fertil Steril* 2002; 77:588-594.
12. Sung L, Copperman AB, Goldstein M, Lapinski R, Bustillo M, Mukherjee T. O-158 Characterization of cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, and TNF $\alpha$ ) in human hydrosalpinx fluid: A potential mechanism for embryo toxicity. *Fertility and Sterility* 1997; 68:S78.
13. Lathbury LJ, Salamonsen LA. In-vitro studies of the potential role of neutrophils in the process of menstruation. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:899-906.
14. Dalgetty DM, Sallenave JM, Critchley HO, Williams AR, Tham WY, King AE, Horne AW. Altered secretory leukocyte protease inhibitor expression in the uterine decidua of tubal compared with intrauterine pregnancy. *Hum Reprod* 2008; 23:1485-1490.



15. Guyot N, Butler MW, McNally P, Weldon S, Greene CM, Levine RL, O'Neill SJ, Taggart CC, McElvaney NG. Elafin, an elastase-specific inhibitor, is cleaved by its cognate enzyme neutrophil elastase in sputum from individuals with cystic fibrosis. *J Biol Chem* 2008; 283:32377-32385.
16. Guedes Neto E de P, Edelweiss MI, de Moraes GS, Cristovam R do A, Savaris RF. The influence of hydrosalpinx on endometrial elafin expression. *Fertil Steril* 2011; 95:2673-2675.
17. Trent M, Chung SE, Forrest L, Ellen JM. Subsequent sexually transmitted infection after outpatient treatment of pelvic inflammatory disease. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2008; 162:1022-1025.
18. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 2001; 23:291-299.
19. Jekel FJ, Elmore JG, Kats DL. Sample size, randomization, and probability theory. In: Jekel FJ, Elmore JG, Kats DL (eds.), *Epidemiology, Biostatistics, and Preventive Medicine*, 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: Saunders; 1996: 159-171.
20. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3:1101-1108.
21. Copperman AB, Wells V, Luna M, Kalir T, Sandler B, Mukherjee T. Presence of hydrosalpinx correlated to endometrial inflammatory response in vivo. *Fertil Steril* 2006; 86:972-976.
22. Lee HY, Schripsema JH, Sigar IM, Murray CM, Lacy SR, Ramsey KH. A link between neutrophils and chronic disease manifestations of *Chlamydia muridarum* urogenital infection of mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 59:108-116.

23. Lee CW, Kim TH, Lee HM, Lee SH, Lee SH, Yoo JH, Kim YS, Lee SH. Upregulation of elafin and cystatin C in the ethmoid sinus mucosa of patients with chronic sinusitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2009; 135:771-775.
24. Mallia P, Footitt J, Sotero R, Jepson A, Contoli M, Trujillo-Torralbo MB, Kebabze T, Aniscenko J, Oleszkiewicz G, Gray K, Message SD, Ito K et al. Rhinovirus infection induces degradation of antimicrobial peptides and secondary bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186:1117-1124.
25. Helps SC, Thornton E, Kleinig TJ, Manavis J, Vink R. Automatic nonsubjective estimation of antigen content visualized by immunohistochemistry using color deconvolution. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012; 20:82-90.

## Table

Table 1. Characteristics of the sample.

Characteristic	Control (n=22)	Hydrosalpinx (n=10)	P value
Age (mean±SD)	45.4±8.1	47.2±11.5	0.6 <sup>a</sup>
Ethnicity n(%)			
Caucasian	19(86.3)	8(80)	0.6 <sup>b</sup>
Afro-Brazilian	3 (13.7)	2(20)	
Parity (mean±SD)	2±1.5	2.7±1.3	0.2 <sup>a</sup>
Indication for surgery			
Leiomyoma	15		
endometrial polyp	6		
endometriosis ovary	1		
Adnexal mass-asymptomatic		7	
pelvic pain		3	

<sup>a</sup> Student *t* test with Welch correction

<sup>b</sup> Fisher's exact test

## Figure legends

### Figure 1

Example of image analysis of a normal Fallopian tube section (A). The built-in vector separates the digital image into 3 panels: hematoxylin (B), 3,3'-diaminobenzidine (DAB; C), and background (D). The “mask” representing the region of interest is depicted in yellow and overlaid on panel C, and DAB intensity was measured by ImageJ software, yielding the mean intensity of DAB immunostaining.

Figure 2. A. Elafin expression in fallopian tubes. Panels show representative images of tissue sections in 6 different cases of normal fallopian tubes (a-f) and in 6 different cases of hydrosalpinxes (g-l). Positive external control—tonsil (m). Scale bars represent 500  $\mu\text{m}$ .

B. Graphical representation of DAB intensity difference between the groups.

Unpaired *t* test with Welch correction was applied. Bar represents the mean.

### Figure 3.

Elafin mRNA expression in hydrosalpinx. Elafin mRNA levels were measured in fallopian tubes with hydrosalpinx ( $n = 9$ ) or without hydrosalpinx (control— $n = 9$ ) and normalized to  $\beta$ -actin. Statistical analysis was performed with unpaired *t* test with Welch correction. mRNA indicates messenger RNA.

## **Artigo Original redigido em Português**

### **Resumo**

Elafina é uma molécula antimicrobiana natural e um membro da família antileucoproteinase (Trappin). É normalmente expressa na mucosa de trompas de falópio. Hydrosalpinx é um processo inflamatório crônico das trompas de falópio. O objetivo deste estudo é comparar a localização de proteínas Elafina e níveis de RNA mensageiro Elafina (mRNA) na mucosa das tubas uterinas com e sem hydrosalpinx. A análise imunohistoquímica foi realizada em cortes de tecidos de hydrosalpinx (n = 10) e tubos normais (n = 22) a partir de blocos embebidos em parafina, obtidos de pacientes que se submeteram à laqueadura para condições benignas. A principal medida foi a intensidade da coloração com 3,3'-diaminobenzidina calculado pelo software ImageJ e expressão de mRNA em tempo real por reação em cadeia da polimerase. A intensidade média de Elafina (média  $\pm$  desvio padrão) na mucosa das trompas de falópio foi de  $69,68 \pm 24,55$  em controles e  $32,03 \pm 18,16$  em pacientes com hydrosalpinx ( $P < 0,0001$ ). Elafina níveis de mRNA foram reduzidos em hidrossalpinges, embora não de forma significativa ( $P = 0,05$ , n = 9 em cada grupo). Portanto, epitélio das trompas de mulheres com hidrossalpinges parece ter uma menor expressão de Elafina, um inibidor da elastase e uma molécula antimicrobiana natural, em comparação com os tubos normais.

### **Introdução**

A elafina é uma molécula antimicrobiana, membro natural da família antileucoproteinase (Trappin), também chamada Trappin-2 [1, 2]. A sua expressão tem sido relatada na cavidade oral [3] e no epitélio do tracto genital feminino [4]. A expressão da elafina no endométrio ocorre apenas durante a menstruação [4]. No entanto, na mucosa das tubas de

Falópio, a sua expressão é constante ao longo do ciclo menstrual [5]. Dentro do útero gravídico, a elafina é liberada pela decídua, pelas membranas e pulmões fetais e é responsável pela regulação das interações parácrinas pró-inflamatórias para manter a gravidez e para limitar as infecções uterinas [6]. Sua função está provavelmente envolvida nas defesas inatas das mucosas que previnem a infecção uterina, nos mecanismos que regulam a reparação antiproteolítica dos tecidos e na menstruação [7]. As mulheres com vaginose bacteriana têm um nível mais baixo de elafina nas secreções cervicais [8]. A hidrossalpinge, um processo inflamatório crônico das tubas de Falópio, a qual é geralmente um resultado final da doença inflamatória pélvica, é um fator de risco conhecido para a gravidez ectópica, infertilidade e baixo sucesso da fertilização in vitro [9, 10]. As metaloproteinases (MMP) são moléculas-chave relacionadas com a degradação do tecido, e elas são um achado comum em hidrossalpinge [11]. Além disso, o fluido da hidrossalpinge é rico em fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), uma citocina pró-inflamatória, que aumenta a expressão do RNAm da elafina [12]. Além disso, o fluido da hidrossalpinge estimula a atividade gelatinolítica total da MMP-2 e MMP-9 [11]. A elastase neutrofilica ativa as MMP-2, 3 e 9, e degrada inibidores teciduais das MMPs (TIMP-1 e TIMP-2) [13]. Em contraste, a elafina inibe a elastase dos neutrófilos e a proteinase 3 [14], enquanto que elastase inibe a elafina [15].

O nosso grupo demonstrou que, na presença de hidrossalpinge, expressão da elafina no endométrio estava reduzida, provavelmente como resultado do seu consumo [16]. Apesar de existirem dados indiretos que sugerem que elafina estaria aumentada na mucosa epitelial da hidrossalpinge, secundariamente a elevada concentração de TNF $\alpha$  no fluido da hidrossalpinge [12], também há dados indiretos que sugerem que a expressão da elafina

estaria diminuída, porque a mucosa epitelial da tuba de Falópio é degradada [11]. Até o momento, não há estudos que relatam a expressão imuno-histoquímica da elafina no epitélio tubário de mulheres com hidrossalpinge (pesquisa no Pubmed: *elafin and hidrossalpinx*, sem limites, a partir de 1966 até dezembro de 2012). O mais próximo artigo relacionado à infecção nas tubas foi publicado por King et al. Esses autores mediram a expressão do RNAm da elafina em um modelo in vitro utilizando uma linha de células do oviduto infectadas agudamente com *C. trachomatis* [5]. A hidrossalpinge é uma condição crônica, enquanto que o modelo in vitro, relatado por King et al., representa um modelo de salpingite aguda. Se a expressão da elafina estiver reduzido na mucosa das pacientes com hidrossalpinge, essa informação poderá explicar por que há o aumento do risco de desenvolvimento de doença inflamatória pélvica em mulheres que tiveram uma doença sexualmente transmissível anterior [17]. A compreensão dos mecanismos envolvidos na formação da hidrossalpinge pode ser a base para pesquisas futuras para investigar novos tratamentos para restabelecer ou manter a capacidade de reprodução das pacientes. Portanto, o objetivo deste estudo foi comparar a expressão da elafina no epitélio tubário de mulheres com e sem hidrossalpinge.

### **Material e métodos**

Para este estudo de caso-controle, tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina foram obtidos a partir dos arquivos do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), a partir de 2010 e 2011. Um patologista experiente revisou as lâminas e confirmou o diagnóstico de tubas com hidrossalpinge e de tubas normais. As tubas normais e com hidrossalpinge foram obtidas a partir de amostras de histerectomia

total por condições benignas (leiomiomas e sangramento uterino disfuncional). Casos com câncer e salpingite aguda foram excluídos.

### ***Imunohistoquímica***

A coloração por imuno-histoquímica foi realizada como previamente relatada [16], utilizando-se o anticorpo primário contra elafina (HM2063-0603 Biotecnologia Hycult, Udem, The Netherlands) na diluição de 1:10. Os controlos negativos externos foram obtidos através da realização da imunocoloração sem o anticorpo primário. As amostras conhecidamente positivas para elafina foram utilizadas como controlos externos positivos. Os cortes foram corados e analisados com um microscópio BX51 da Olympus (Olympus Optical Co., Tóquio, Japão) conectado a uma câmara digital a cores / Q-Color 5 (Olympus). A lâmina foi avaliada usando várias imagens digitais, um campo microscópico = uma imagem. As imagens foram obtidas com uma objetiva de 4X UPLanFI (resolução: 2.75µm), com um tamanho de 2560x1920 pixels (resolução: 40µm = 1800 pixels), sob condições de iluminação padronizadas.

### ***Análise com ImageJ***

A fim de reduzir o viés, cada slide foi codificado e cegamente analisadas com o software ImageJ análise de imagens (ImageJ v1.43j; National Institutes of Health, Bethesda, MD, disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). A secção transversal do conjunto com o epitélio luminal foi usada como a área desejada para ser analisado na trompa de Falópio normal. Em trompas de Falópio com hidrossalpinges, todo o epitélio luminal apresentado na lâmina foi selecionado. Depois de selecionar a área desejada para ser analisado, a imagem selecionada foi submetida ao procedimento analítico "color deconvolution", escrito como built-in "plugin" para ImageJ, utilizando a hematoxilina e 3,3'-diaminobenzidina (DAB)



built-in vector (HDAB) .18 Este embutido HDAB vector separa a imagem digital (Figura 1A) em três painéis diferentes, um com hematoxilina, um segundo painel com apenas DAB, e um terceiro painel de fundo (Figura 1B e C). Das 3 imagens obtidas a partir de "color deconvolution", a imagem só de hematoxilina foi selecionado e convertido em uma imagem binária. A "máscara" foi criada para identificar a região de interesse (ROI manager), e foi salvo em um arquivo. A imagem com DAB intensidade foi selecionado, e a "máscara" foi sobreposto na imagem (Figura 1E). A intensidade da coloração DAB e a área total foram medidas pelo software, obtendo-se as médias da intensidade da imunocoloração DAB do ROI. Quando múltiplas imagens foram tiradas a partir da mesma amostra, a intensidade média de DAB foi calculada. A intensidade final DAB foi calculada de acordo com a fórmula:  $f = 255 - i$ , onde  $f$  = intensidade DAB final e  $i$  = média intensidade DAB obtida a partir do software. A intensidade final DAB variou de 0 (branco, sem expressão) a 255 (marrom escuro, expressão mais elevada).

### ***Isolamento de RNA e análise em tempo real PCR***

O RNA total foi extraído a partir do tecido embebido em parafina das tubas de Falópio fixadas em formalina usando a alta FFPE RNA Micro Kit (Roche, Indianapolis, Indiana) segundo as instruções do fabricante a partir de 10 amostras de cada grupo. A concentração de RNA foi medida usando NanoDrop 2000 espectrofotômetro (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware). A transcrição reversa foi realizada utilizando o estojo Omniscript RT (Qiagen, Valência, Califórnia) seguindo as instruções do fabricante. Em tempo real da reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-PCR) foi realizada usando as sequências iniciadoras Elafina forward 5'-TGGCTCCTGCCCCATTATC-3' e reverse 5'-CAGTATCTTTCAAGCAGCGGTTAG-3',  $\beta$ -actina forward 5'-GATGAGATTGGCATGGCTTT-3' e reverse 5'-CACCTTCACCGGTCCAGTTT-3', e'

SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia). As amostras foram submetidas a ciclos de 15 segundos a 95 ° C, 1 minuto a 60 ° C (Elafina) e 30 segundos a 95 ° C, 30 segundos a 60 ° C ( $\beta$ -actina) em um termociclador C1000 com CFX96 Sistema Real-Time (bio-Rad, Hercules, Califórnia). Os níveis de ARNm Elafina foram identificadas utilizando o método de ciclo limiar comparativa por ABI Prism 7000 software SDS (Boletim do utilizador No. 2, ABI Prism 7700 Sequence Detection System; Applied Biosystems) para normalizar  $\beta$ -actina.

#### Ética, Cálculo do Tamanho da Amostra e Estatística

O comitê de ética local, Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, aprovou o estudo (número 11-0238). O comitê de ética decidiu renunciar consentimento informado por escrito dos pacientes, porque as amostras foram obtidas a partir de arquivos de patologia. No entanto, os autores do estudo assinaram uma declaração para preservar a privacidade dos pacientes, e todos os dados foram utilizados exclusivamente para este estudo. O tamanho da amostra para análise imunohistoquímica foi calculado de acordo com a fórmula  $n = [(z\alpha + z\beta) \cdot 2 \cdot (s) \cdot 2] / (d)^2$ , como descrito<sup>19</sup> usando os seguintes parâmetros: um erro  $\alpha$  ( $z\alpha$ ) = 0,05, um poder ( $z\beta$ ) = 0,8, um desvio-padrão da estimativa (SD) de Elafina de 18, assim variância ( $s$ ) = 2 324, e a diferença ( $d$ ) de 25 pontos para ser encontrado em uma escala que varia de 0 a 255 (ou seja, uma diferença de 10%). A variação foi obtida a partir de um estudo piloto com 19 casos de tubos normais. Estes números renderam um tamanho de amostra de pelo menos oito casos em cada grupo.

GraphPad Prism versão 5 para Macintosh (GraphPad Software, Inc, San Diego, Califórnia) foi realizada para análise estatística, utilizando o teste t de Student não pareado com correção de Welch para comparar a expressão de Elafina (intensidade final DAB) em

epitélio tubário dos dois grupos se dados teve uma distribuição de Gauss; caso contrário, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para dados não paramétricos, foi utilizado o teste exato de Fisher. Teste de Mann-Whitney foi utilizado para a análise estatística dos resultados de RT-PCR, comparando os valores médios de cada grupo como pontos de dados individuais, usando  $2^{-\Delta Ct}$  e considerando um valor  $P < 0,05$  como significativo.<sup>20</sup>

## **Resultados**

Um total de 32 amostras foi obtido (10 hidrossalpinges; 22 controles). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quando a idade, etnia, paridade foram analisados. Não houve correlação significativa entre a idade do paciente e expressão Elafina por imuno marcação (coeficiente de  $r^2 = 0,05$ ,  $P = 0,3$ -correlação ( $r = -0,2$ , intervalo de confiança de 95% = -0,6 a 0,2-dados não apresentados ). Outras características das amostras são mostradas na Tabela 1. Todos os valores para intensidade DAB e RT-PCR passou no teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, e teste t não emparelhado com correção Welch foi usado quando a média  $\pm$  SD foi apresentada.

### **A imuno-histoquímica**

Controlo positivo externo para Elafina fortemente coradas com DAB (Figura 2A-n). Elafina expressão foi consistentemente uniforme em todos os segmentos e ístmicas ampulares das trompas de falópio (dados não mostrados). Figura 2A (af) representa os cortes de tecidos normais de 6 diferentes trompas de falópio com expressão positiva da Elafina (marrom escuro). Elafina está localizada no citoplasma e, em alguns casos dentro do núcleo da parte epitelial da mucosa. Seções de hidrosalpinge tiveram menor ou nenhuma expressão Elafina (Figura 2A [gl]). A intensidade média de Elafina (média  $\pm$  DP) na mucosa das trompas de

falópio foi de  $69,68 \pm 24,55$  em controles e  $32,03 \pm 18,16$  em pacientes com hidrossalpinge (Teste t não pareado com correção de Welch  $P < 0,0001$ -Figura 2B).

### **Análise por Real-time PCR**

A partir das 10 amostras escolhidas ao acaso em cada grupo, apenas 9 amostras foram utilizadas para análise RT-PCR quantitativo para determinar as potenciais alterações nos níveis de RNAm da Elafina nas amostras. Uma amostra não rendeu RNA suficiente, e outra tinha RNA degradado. Embora os valores médios ( $\pm$  DP) do percentual de Elafina mRNA / expressão de mRNA  $\beta$ -actina em hidrossalpinge ( $0,04 \pm 0,02$ ) foram reduzidas em comparação com grupos de controle ( $0,08 \pm 0,05$ ), essa diferença não foi significativa ( $P = 0,05$ ), como mostrado na Figura 3.

### **Discussão**

Os dados aqui apresentados demonstram que a expressão da proteína é reduzida Elafina sobre o epitélio da mucosa do oviduto com hidrossalpinges, e os níveis de mRNA teve uma alteração de 2 vezes em comparação com hidrossalpinges, mas eles não foram significativamente diferentes ( $P = 0,05$ ). Nós não fomos capazes de recuperar todos os dados deste paciente, exceto para a nossa própria publicação<sup>16</sup> anterior. Portanto, as explicações possíveis para nossas descobertas podem ser explicadas através de evidências indiretas. A baixa expressão da proteína Elafina associado ao tecido, hidrossalpinges poderia estar relacionada com a sua produção reduzida e / ou aumento da secreção e degradação. Jastrow et al, utilizando um modelo in vitro, relataram que o fluido hidrossalpinges estimula a actividade gelatinolítica total de células citotrofoblástica através da actividade de MMP-2 e MMP-9, que não foram neutralizadas pelos seus inibidores, isto é, TIMP-1 e Elafina<sup>11</sup> Copperman et al descobriram que há um aumento significativo no

número de neutrófilos em tissue.<sup>21</sup> hidrossalpinges Lee et al, utilizando um modelo de ratos mostrou que a formação de hidrossalpinges está relacionada com o aumento da produção de MMP-9,<sup>22</sup> Guyot et al mostraram que na presença de um excesso de elastase de neutrófilos, a Elafina é quebrada<sup>15</sup>. A partir destes dados, pode-se inferir que as concentrações aumentadas de elastase a partir de neutrófilos derivados resultar no aumento da degradação da proteína Elafina e, portanto, pode ser responsável por níveis baixos de Elafina na análise imuno-histoquímica.

King et al, utilizando um modelo in vitro de linha celular OE-E6 / E7 epitelial oviductal infectados com *C. trachomatis*, demonstraram que os níveis de mRNA Elafina foram aumentadas durante infecção aguda.<sup>5</sup> Este estudo in vitro reflete uma condição aguda e pode ser diferente a partir das respostas observados na condição crônica de hidrossalpinge. Em algumas condições crônicas, tais como sinusite crônica, Elafina é altamente expressa na mucosa<sup>23</sup>, mas em outros, como a doença pulmonar obstrutiva crônica, infecções virais com infecções bacterianas secundárias reduzem a expressão da Elafina.<sup>24</sup> Estas observações indicam que a regulação da expressão e o catabolismo da Elafina são complexas e possivelmente tecido específico. Embora não se observou qualquer significado estatístico, os valores médios do RNAm a partir das tubas de falópio normais é maior do que do grupo com hidrossalpinge, como mostrado na Figura 3. Uma possível explicação para não encontrar uma diferença significativa entre os grupos pode estar relacionado com o fato de que todo o tecido embebido incluído em parafina foi utilizado para a análise do RNAm, enquanto que em ImageJ, fomos capazes de selecionar apenas a mucosa do oviduto. Uma análise de captura com laser resolveria este problema e poderia ser utilizado em trabalhos futuros.

Um aspecto positivo deste estudo foi o uso do software ImageJ para quantificar a intensidade DAB para a coloração Elafina. O único fator humano relacionado com esta quantificação foi a seleção da imagem. A consistência obtida com software de imagem está em conformidade com ajuda *et al* que usou ImageJ para a expressão DAB no tecido cerebral.<sup>25</sup> O ImageJ foi usado em vez de outros métodos semiquantitativos, porque não fomos capazes de obter baixa variabilidade inter e intra-observador nos resultados. O uso de software ImageJ eliminou este problema. Outro aspecto positivo do estudo foi o cálculo do tamanho da amostra (análise de poder). Apesar do tamanho relativamente pequeno da amostra, foi demonstrado que com o tamanho atual da amostra, a análise de poder foi adequada. O aumento da diferença de intensidade DAB reduziria o tamanho da amostra de acordo com a fórmula dada na secção Materiais e Métodos.

No entanto, existem algumas limitações no estudo que devem ser abordada. Nenhum estudo mecanicista foi feito para explicar por que a expressão imunohistoquímica da Elafina estava diminuída na hidrossalpinge, mas este não era o objetivo do estudo. Nós não temos dados relacionados com doença sexualmente transmissível anterior de pacientes com hidrossalpinge ou identificação de *C. trachomatis*. A paridade entre os grupos não foi significativamente diferente, mesmo na presença de hidrossalpinge, um fator de infertilidade. É possível que essas condições tenham iniciado mais tarde, já que a média de idade de ambos os grupos foi entre 45 e 47 anos.

Em conclusão, observou-se que a expressão da proteína Elafina nos tecido está reduzida na mucosa que reveste os ovidutos com hidrossalpinges em comparação com as tubas de falópio normais. Esta redução foi sugerida por níveis de RNAm reduzidas, embora nenhuma diferença estatística foi encontrada.

A potencial relevância clínica destes resultados pode estar relacionada ao fato de que a Elafina é um antibacteriano adjuvante na defesa da mucosa e é uma antiprotease. Se Elafina for uma molécula antimicrobiana e antiprotease clinicamente útil, ela poderia ser usada como um tratamento adjuvante na doença inflamatória pélvica para reduzir os danos nas tubas de Falópio; ou como nova terapia adjuvante para tecnologias reprodutivas assistidas nas pacientes com hidrossalpinge que sejam candidatas a fertilização *in vitro*. A regulação da Elafina no processo inflamatório agudo e crônico das trompas é uma área que precisa de mais investigação.

## Referências

1. Baranger K, Zani ML, Chandenier J, Dallet-Choisy S, Moreau T. The antibacterial and antifungal properties of trappin-2 (pre-elafin) do not depend on its protease inhibitory function. *FEBS J* 2008; 275:2008-2020.
2. Moreau T, Baranger K, Dade S, Dallet-Choisy S, Guyot N, Zani ML. Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family. *Biochimie* 2008; 90:284-295.
3. Shugars DC. Endogenous mucosal antiviral factors of the oral cavity. *J Infect Dis* 1999; 179 Suppl 3:S431-5.
4. King AE, Critchley HO, Kelly RW. Innate immune defences in the human endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:116.
5. King AE, Wheelhouse N, Cameron S, McDonald SE, Lee KF, Entrican G, Critchley HO, Horne AW. Expression of secretory leukocyte protease inhibitor and elafin in human fallopian tube and in an in-vitro model of *Chlamydia trachomatis* infection. *Hum Reprod* 2009; 24:679-686.

6. Simmen RC, Michel FJ, Fliss AE, Smith LC, Fliss MF. Ontogeny, immunocytochemical localization, and biochemical properties of the pregnancy-associated uterine elastase/cathepsin-G protease inhibitor, antileukoproteinase (ALP): monospecific antibodies to a synthetic peptide recognize native ALP. *Endocrinology* 1992; 130:1957-1965.
7. King AE, Critchley HO, Sallenave JM, Kelly RW. Elafin in human endometrium: an antiprotease and antimicrobial molecule expressed during menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4426-4431.
8. Stock SJ, Duthie L, Tremaine T, Calder AA, Kelly RW, Riley SC. Elafin (SKALP/Trappin-2/proteinase inhibitor-3) is produced by the cervix in pregnancy and cervicovaginal levels are diminished in bacterial vaginosis. *Reprod Sci* 2009; 16:1125-1134.
9. Savaris RF, Giudice LC. The influence of hydrosalpinx on markers of endometrial receptivity. *Semin Reprod Med* 2007; 25:476-482.
10. Strandell A, Lindhard A, Waldenstrom U, Thorburn J, Janson PO, Hamberger L. Hydrosalpinx and IVF outcome: a prospective, randomized multicentre trial in Scandinavia on salpingectomy prior to IVF. *Hum Reprod* 1999; 14:2762-2769.
11. Jastrow N, Chardonnens D, Araman M, Meisser A, Campana A, Bischof P. Effect of hydrosalpinx fluid on secretion of trophoblastic matrix metalloproteinases. *Fertil Steril* 2002; 77:588-594.
12. Sung L, Copperman AB, Goldstein M, Lapinski R, Bustillo M, Mukherjee T. O-158 Characterization of cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, and TNF $\alpha$ ) in human hydrosalpinx fluid: A potential mechanism for embryo toxicity. *Fertility and Sterility* 1997; 68:S78.



13. Lathbury LJ, Salamonsen LA. In-vitro studies of the potential role of neutrophils in the process of menstruation. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:899-906.
14. Dalgetty DM, Sallenave JM, Critchley HO, Williams AR, Tham WY, King AE, Horne AW. Altered secretory leukocyte protease inhibitor expression in the uterine decidua of tubal compared with intrauterine pregnancy. *Hum Reprod* 2008; 23:1485-1490.
15. Guyot N, Butler MW, McNally P, Weldon S, Greene CM, Levine RL, O'Neill SJ, Taggart CC, McElvaney NG. Elafin, an elastase-specific inhibitor, is cleaved by its cognate enzyme neutrophil elastase in sputum from individuals with cystic fibrosis. *J Biol Chem* 2008; 283:32377-32385.
16. Guedes Neto E de P, Edelweiss MI, de Moraes GS, Cristovam R do A, Savaris RF. The influence of hydrosalpinx on endometrial elafin expression. *Fertil Steril* 2011; 95:2673-2675.
17. Trent M, Chung SE, Forrest L, Ellen JM. Subsequent sexually transmitted infection after outpatient treatment of pelvic inflammatory disease. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2008; 162:1022-1025.
18. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 2001; 23:291-299.
19. Jekel FJ, Elmore JG, Kats DL. Sample size, randomization, and probability theory. In: Jekel FJ, Elmore JG, Kats DL (eds.), *Epidemiology, Biostatistics, and Preventive Medicine*, 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: Saunders; 1996: 159-171.
20. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3:1101-1108.

21. Copperman AB, Wells V, Luna M, Kalir T, Sandler B, Mukherjee T. Presence of hydrosalpinx correlated to endometrial inflammatory response in vivo. *Fertil Steril* 2006; 86:972-976.
22. Lee HY, Schripsema JH, Sigafoos IM, Murray CM, Lacy SR, Ramsey KH. A link between neutrophils and chronic disease manifestations of *Chlamydia muridarum* urogenital infection of mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 59:108-116.
23. Lee CW, Kim TH, Lee HM, Lee SH, Lee SH, Yoo JH, Kim YS, Lee SH. Upregulation of elafin and cystatin C in the ethmoid sinus mucosa of patients with chronic sinusitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2009; 135:771-775.
24. Mallia P, Footitt J, Sotero R, Jepson A, Contoli M, Trujillo-Torralbo MB, Kebabdzic T, Aniscenko J, Oleszkiewicz G, Gray K, Message SD, Ito K et al. Rhinovirus infection induces degradation of antimicrobial peptides and secondary bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186:1117-1124.
25. Helps SC, Thornton E, Kleinig TJ, Manavis J, Vink R. Automatic nonsubjective estimation of antigen content visualized by immunohistochemistry using color deconvolution. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012; 20:82-90.

Tabela 1. Características da amostra.

Características	Controle	Hidrossalpinge	valor <i>P</i>
	(n=22)	(n=10)	
Idade (média±DP)	45.4±8.1	47.2±11.5	0.6 <sup>a</sup>
Etnicidade n(%)			
Caucasiana	19(86.3)	8(80)	0.6 <sup>b</sup>
Afro-Brasileiron	3 (13.7)	2(20)	
Paridade (média±DP)	2±1.5	2.7±1.3	0.2 <sup>a</sup>
Indicação para a cirurgia			
Leiomioma	15		
pólipo endometrial	6		
endometriose do ovário	1		
Massa anexial assintomática		7	
dor pélvica		3	

<sup>a</sup> Teste *t* de Student com correção de Welch

<sup>b</sup> Teste exato de Fisher

## Legenda das Figuras

### Figura 1

Exemplo de análise de imagem de uma secção de tubo de Falópio normal (A). A built-in vector separa a imagem digital em três painéis: hematoxilina (B), 3,3-diaminobenzidina (DAB; C) e fundo (D). A "máscara" que representa a região de interesse é representada em amarelo e sobreposto sobre o painel C, e DAB intensidade foi medida por software ImageJ, obtendo-se a intensidade média de DAB imunocoloração.

### Figura 2.

A. Expressão da Elafina nas trompas de falópio. Painéis mostram imagens representativas de cortes de tecido em 6 casos diferentes de trompas normais (A-F) e em 6 casos diferentes de hidrossalpinges (g-l). Positivo controle: amígdalas externo (m). As barras de escala representam 500  $\mu\text{m}$ .

B. Representação gráfica da diferença da intensidade do DAB entre os grupos. Teste t não pareado com correção de Welch foi aplicado. Barra representa a média.

### Figura 3.

Expressão do RNAm da Elafina em hidrossalpinges. Os níveis de RNAm da Elafina foram medidos nas trompas com hidrossalpinges (n = 9) ou sem hidrossalpinges (controle -n = 9) e normalizado com  $\beta$ -actina. A análise estatística foi realizada com o teste t não pareado com correção de Welch. mRNA indica RNA mensageiro.

**Anexo 1. Figuras**

**Figure 1**

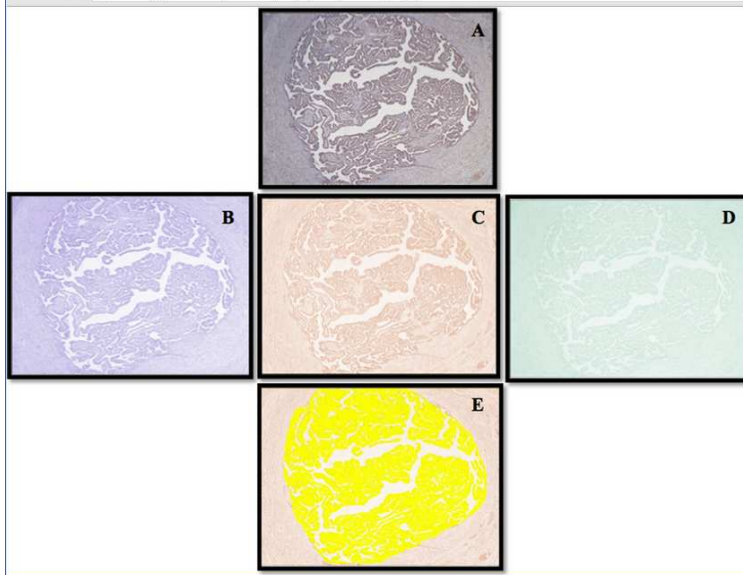


Figure 2A

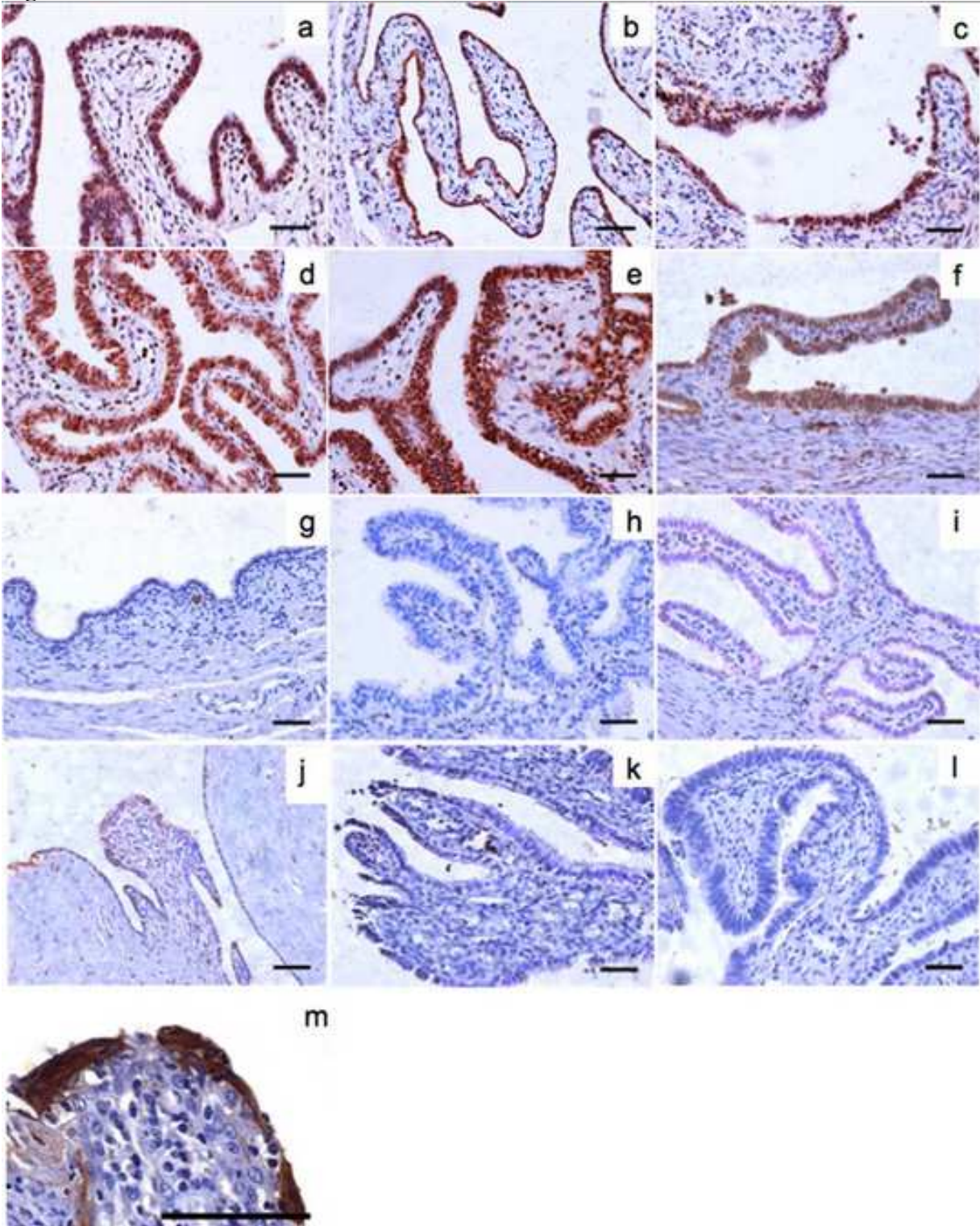


Figure 2B

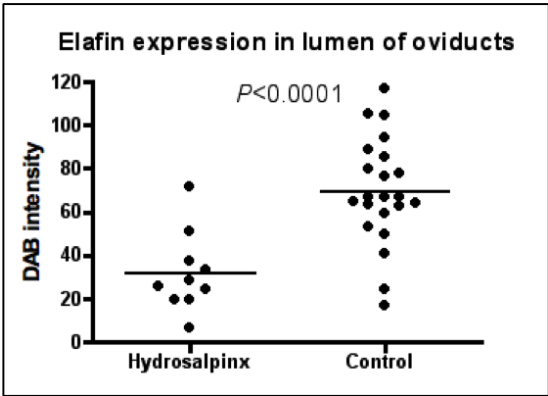


Figure 3

