

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

Influência da hidrossalpinge na expressão da elafina endometrial

Autor: Ernesto de Paula Guedes Neto
Orientador: Prof. Ricardo Francalacci Savaris
Co-Orientadora Maria Isabel Edelweiss

Dissertação de Mestrado

2011

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

Influência da hidrossalpinge na expressão da elafina endometrial

Autor: Ernesto de Paula Guedes Neto
Orientador: Prof. Ricardo Francalacci Savaris
Co-Orientadora Maria Isabel Edelweiss

Dissertação de Mestrado

2011

J357a Guedes Neto, Ernesto de Paula

Influência da hidrossalpinge na expressão da elafina endometrial / Ernesto de Paula Guedes Neto ; orient. Ricardo Francalcci Savaris ; co-orient Maria Isabel Edelweiss 2011

59 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas. Porto Alegre, BR-RS, 2011

1. Elafina 2. Hidrossalpinge 3. Endométrio I. Guedes Neto, Ernesto de Paula II. Savaris, Ricardo Francalacci

III. Título

NLM: WJ 342

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

AGRADECIMENTOS e DEDICATÓRIA

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

Em especial a

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

ÍNDICE

Introdução.....	7
Revisão da Literatura	9
Sistema Imune Inato.....	9
Elafina	10
Elafina em outros órgãos.....	14
O Sistema Imune Inato no trato genital feminino	15
Expressão da elafina no ciclo menstrual	18
Regulação da expressão da elafina.....	19
A relação da elafina e os inibidores da protease secretada por leucócitos com os métodos anticoncepcionais.....	19
Hidrossalpinge	20
Referências Bibliográficas	21
Objetivos	28
Artigo Original redigido em Inglês	29
Artigo Original redigido em Português.....	43
Anexo 1. Fotos ImageJ.....	57
Anexo 2 – Aceite do manuscrito na revista Fertility and Sterility	58

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)

β -defensinas humanas (HBD):

Interleucina 1 β (IL-1 β)

Fator de necrose tumoral α (TNF- α)

Fator de crescimento tumoral β 2 (TGF β 2)

Introdução

O Trato genital feminino devido as suas características anatômicas e funcionais encontra-se sujeito a constante agressão por agentes patógenos. A vagina e a ectocervix são locais que apresentam bactérias comensais, como o *Lactobacillus acidophilus*, mas também servem como porta de entrada para outros microrganismos responsáveis por diversas infecções secundárias. O endométrio e a tuba de Falópio, por sua vez, são ambientes estéreis. Quando os agentes infecciosos se instalam na tuba de Falópio, ocorre um processo inflamatório agudo, denominado de salpingite, que, quando não tratado adequadamente, evolui para um processo crônico, conhecido como hidrossalpinge (1)

A função básica dos mecanismos de defesa do organismo é combater a infecção através do processo inflamatório. Este processo compreende no reconhecimento e destruição do agente agressor. Entretanto, existe a necessidade de mecanismos que controlem a extensão da destruição, uma vez que podem ocorrer lesões dos tecidos saudáveis (2). O Sistema Imune Inato e o Adaptativo são fundamentais na manutenção da homeostase e na proteção deste micro-ambiente, entre os fatores envolvidos nesta proteção, podemos citar as moléculas elafina e o inibidor da protease secretada pelos leucócitos (3). Quando ocorre um desequilíbrio nesse processo, em especial no trato genital feminino, podem ocorrer sequelas teciduais como, por exemplo, a hidrossalpinge, que por sua vez tem influência sobre a receptividade endometrial (4).

A hidrossalpinge é uma das causas de infertilidade e, quando presente, compromete os resultados das fertilizações *in vitro* (5). Essa dissertação irá primeiramente, rever os

conceitos sobre o Sistema Imune Inato (SII) e a hidrossalpinge. A posteriori, estudará a influência da hidrossalpinge sobre a expressão da elafina no endométrio.

Revisão da Literatura

Sistema Imune Inato

O sistema de defesa dentro das suas atribuições está adaptado para atuar no trato genital feminino, o qual sofre alterações hormonais e modificações celulares, principalmente durante a menstruação, quando ocorre a morte celular e atividade de necrose.

O Sistema Imune Inato é a primeira linha de defesa do corpo humano e possui uma capacidade de reação rápida, quando comparada ao Sistema Imune Adaptativo (SIA) (3).

O SII, além proteger, deve permitir as funções fisiológicas que incluem a fertilização, implantação, gravidez e parto (6).

O SII utiliza diferentes mecanismos de defesa na superfície epitelial, tais como, a alteração do pH do ambiente e a ativação dos antibióticos naturais (7). No momento em que, esta primeira linha de defesa é ultrapassada por patógenos, como vírus, fungos e bactérias, ocorre a ativação dos receptores *toll-like* (7;8). Esses receptores, localizados nos tecidos, determinam a síntese e liberação dos antibióticos naturais, tais como as defensinas, e as proteínas que apresentam um motivo da proteína ácida, do soro do leite (WAP - *wh*ey *acidic protein*) (9). As proteínas com motivo WAP incluem os inibidores da protease secretada por leucócitos (IPSL) e a elafina, que apresentam uma ação citotóxica contra os patógenos (8). A elafina e o 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 contras às infecções. Este 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(10). Na fase aguda da infecção, ocorre o estímulo de neutrófilos secretores de elastases, entre outras proteases. Todos estes 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 de 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 para os neutrófilos. Essa regulação positiva da IL-8 pela elastase dos neutrófilos ocorre devido a ligação na superfície das células, com os receptores *Toll-like Receptor 4* (TLR4) (14). Como consequência da liberação de elastase no meio, pode ocorrer uma destruição sem controle do tecido adjacente (15). Para controlar essa destruição a elafina, IPSL e os Peptídeos Antibióticos Naturais (PAN), com ação anti-protease, possuem papel fundamental, agindo como fatores de proteção e controle da reação inflamatória (16;17).

Elafina

A elafina vem sendo pesquisada desde a década de 70 sobre uma variedade de nomes, entre eles, podemos citar inibidor específico de elastase, precursor da elafina-ESI (PELESI),

antileucoprotease derivada da pele (SKALP) e trapina2 (18-22) ou trappin-2 (23). Ela pertence à família de proteínas conhecida como “*Trappin Gene Family*” (TRansglutaminase ;domínio WAP, contendo ProteINa) (9). O gene da elafina codifica uma proteína com massa molecular de 9,9 kDa, constituída de 117 aminoácidos (9). A elafina está presente, principalmente nas mucosas e tecidos, dos seres humanos, tanto em adultos (24), como de fetos (25;26). A Elafina é um lipopolissacarídeo com ação antimicrobiana (27;28), e também atua sobre o controle da função das proteases: elastase e protease-3 (9).

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 dissulfídicas 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 sequencia característica de valina, lisina, glicina e glutamina (VKGQ) referido como “*cementoin*” ou “*trappin*”, que promove substrato para enzima transglutaminase. Este segundo domínio permite a enzima interagir no ambiente extracelular e no interior dos polímeros determinando a sua segunda ação: bactericida natural (9;29).

Ricardo S
Deleted:

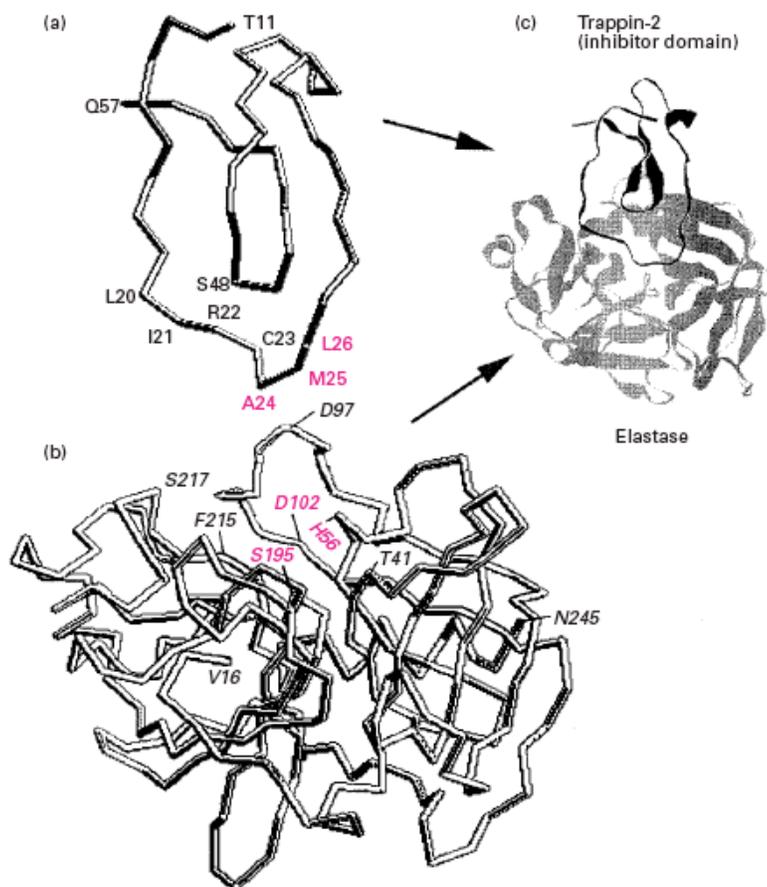


Figura 1. Interação entre a elastase e o domínio inibitório da trapina-2 (SKALP/elafina). (a) desenho da estrutura básica do domínio da trapina-2 humana (SKALP/elafina). O domínio indicado (Treonina 11 – T11; Glutamina 57 – Q57) correspondem aos resíduos 71±117 do precursor da trapina-2. Os locais de 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. *Biochem J* 1999; 340 (Pt 3):569-577)(9).

Esta proteína possui uma importância significativa na interação entre o SII e o SIA. A ação antiprotease tem como objetivo evitar a lise celular excessiva e consequentemente destruição tecidual descontrolada, desencadeada pelas proteases durante o processo inflamatório (29;30).

Em seres humanos, foram identificados cinco tipos diferentes de trapinas, entretanto existem poucos dados sobre a real atividade destas proteínas (29).

A elafina é encontrada nos neutrófilos endometriais (localizada 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 (31).

Enquanto o IPSL é capaz de inibir a elastase, catepsina G, tripsina, 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 (8).

A [Tabela 1](#), apresenta algumas das funções da elafina, além da atividade antiprotease

Tabela 1. Funções conhecidas da elafina

Atividade	Referência
1. Antibactericida	(32-35)
2. Anti-inflamatória	
<ul style="list-style-type: none"> • Inibição do recrutamento do infiltrado inflamatório 	(36;37)
<ul style="list-style-type: none"> • Inibição da ativação do NF-k B 	(38)
3. Preparo da Imunidade Inata	
<ul style="list-style-type: none"> • Quimiotaxia dos neutrófilos 	(39;40)
<ul style="list-style-type: none"> • Inibição da regulação negativa mediada por neutrófilos das atividades induzidas pelo C5a em outros neutrófilos. 	(41)
<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da resposta aos lipopolissacarídeos (LPS) <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> 	(39;40,42)
4. Remodelação tecidual e diferenciação celular	
<ul style="list-style-type: none"> • Envolvimento no desenvolvimento da glândula salivar 	(26)

Elafina em outros órgãos

A elafina é expressa em diferentes tecidos, em especial nas mucosas, quase sempre relacionada à ação antiinflamatória. Ela está associada aos processos inflamatórios crônicos pulmonares (43) e cutâneos, como a psoríase(44). Além disso, ela também é expressa nas glândulas submandibulares (26) e em processos inflamatórios crônicos do trato gastrointestinal, como na Doença de Crohn (45).

Em indivíduos transplantados, a elafina está envolvida com os eventos de rejeição (37).

O Sistema Imune Inato no trato genital feminino

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. Este último compreende a vagina, cérvix e junção escamo-colunar externa. (6)

Ricardo S
Deleted:

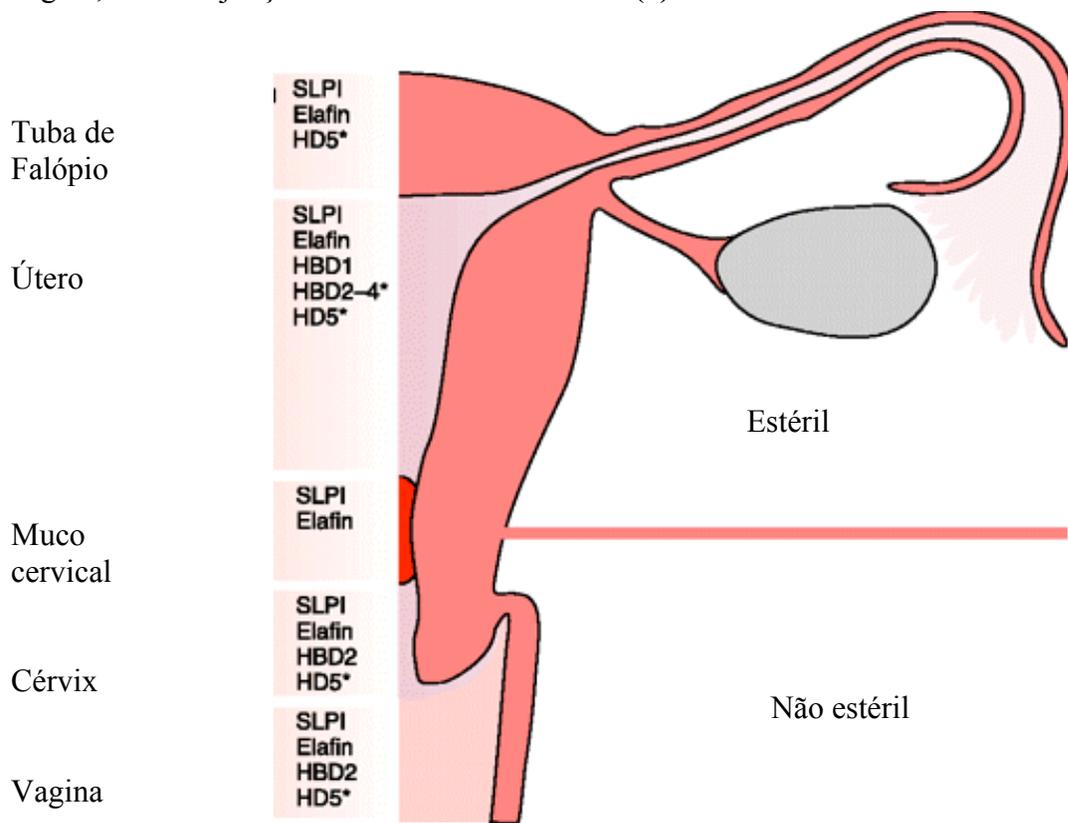


Figura 2. Expressão de IPSL, elafina e defensina no trato genital feminino de mulheres não grávidas. Adaptado da referência (6)

No sistema reprodutor feminino foram relatados diferentes peptídeos com ação antimicrobiana. Além da elafina e do IPSL, encontramos as α -defensinas localizadas nos neutrófilos, as defensinas humanas nos epitélios e as β -defensinas humanas (HBD): HBD1, HBD2, HBD3, HBD4 e HD5 encontradas nas superfícies epiteliais. A distribuição da expressão das β -defensinas 1-4 (HBD 1-4), do IPSL e da elafina, durante o ciclo menstrual, estão representados na [Figura 3](#),(46).

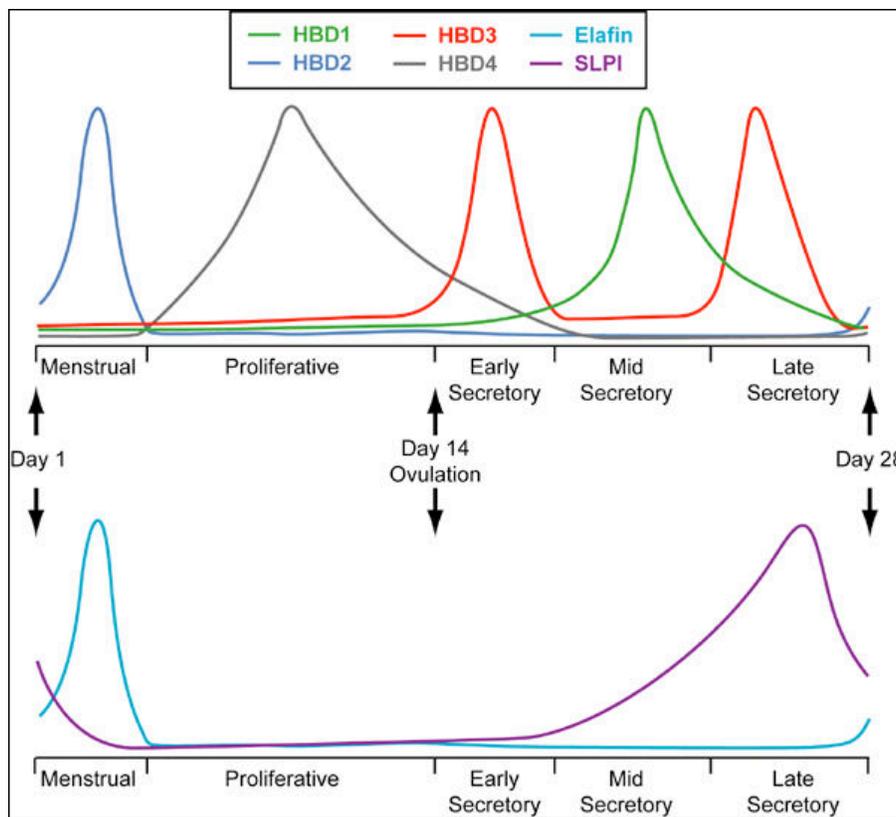


Figura 3. Representação do pico de expressão das β -defensinas HBD 1-4, IPSL e da elafina no endométrio durante o ciclo menstrual. (Retirado da referência (46) doi: 10.1186/1477-7827-1-116)

Diversos estudos têm avaliado a expressão da elafina no trato genital feminino, um resumo da sua localização e forma de expressão estão apresentados 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 _m e Proteínas	(47)
Endométrio não grávida	RNA _m elevada no ciclo menstrual	(46)
Endométrio em gestação ectópica	RNA _m elevado	(48)
Cervix	Proteína	(49)
Vagina	Proteína	(24)
	RNA _m	(50)
Amnion	RNA _m e Proteína	(46;51)
Córion	RNA _m e Proteína	(46)
Placenta	RNA _m e Proteína	(46)
Decídua	RNA _m e Proteína	(46)
Muco cervical		Sem dados publicados
Secreção vaginal		Sem dados publicados

RNA_m: 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 (52).

A expressão da elafina durante o ciclo menstrual inicia no final da fase secretora e atinge o seu ápice no período menstrual (31), 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- β e Fator de necrose tumoral α (53). 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 participe no controle do processo inflamatório, onde o tecido endometrial necrótico e o sangue favorecem a proliferação bacteriana (31).

Ricardo S
Deleted:

Regulação da expressão da elafina

Os mediadores inflamatórios interleucina 1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) regulam positivamente a expressão da elafina (31;54). Apesar da estrutura sólida da elafina, sabe-se que certas metaloproteinases bacterianas, tais como as secretadas por *Pseudomonas aeruginosa*, apresentam a capacidade de inativação da fração antiprotease da elafina. Estas metaloproteinases, quando presentes *in vitro*, determinam uma expressão maior da elastase (55-57). 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 (58). Além disso, o IPSL e a elafina tem a sua expressão diminuída na cérvix e na vagina, na presença de vaginose bacteriana (49).

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 (59).

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.

Como já comentamos, os peptídeos antimicrobianos são expressos em vários locais do trato genital feminino ([Figura 2](#)). O uso de acetato de medroxiprogesterona em depósito inibe a expressão endometrial do IPSL (60), enquanto que as pílulas anticoncepcionais e o sistema intra-uterino de levonorgestrel não (61). 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 (61).

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 ultra-som (62;63), chegando a 30% quando diagnosticado por laparoscopia (64). Sob a visão 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 ocorre a perda dos cílios e o acúmulo de fluidos ricos em células inflamatórias (65). A ocorrência da hidrossalpinge está relacionada aos processos inflamatórios decorrentes de Doenças Inflamatórias Pélvicas, sendo o principal agente a *Clamydia Trachomatis* (66).

A hidrossalpinge é uma importante causa de infertilidade do tipo tubário. Ela também está vinculada à gênese da gravidez ectópica (67;68) e, principalmente, está associada aos insucessos, tanto das fertilizações *in vitro*, como na transferência dos embriões (5). Os fatores tóxicos, presentes no endométrio de mulheres com hidrossalpinge, criam um ambiente inadequado e provocam a morte dos jovens embriões (69). Esses baixos índices de gravidez pós-fertilização *in vitro* ocorrem, provavelmente, devido a uma receptividade endometrial comprometida (70). A totalidade dos mecanismos de interferência da fertilidade e do desenvolvimento dos embriões transplantados ainda não são bem conhecidos na hidrossalpinge, mas se acredita em uma associação de fatores mecânicos e

embriotóxicos (10;71). Os fatores mecânicos ocorrem pelo contra fluxo de secreções, que determinam uma dificuldade na instalação dos embriões no endométrio (72), este fluxo de secreções na cavidade endometrial é compatível com o observado nas descargas cervicais, comuns nestes casos (73).

A IL-8 e o TNF- α possuem uma ação deletéria sobre o desenvolvimento e a implantação do embrião (74). O fluido da hidrossalpinge é rico em citocinas, como interleucina 8 (IL-8), IL-12, IL-1 α , TNF α e Fator de crescimento tumoral β 2 (TGF β 2) (74). 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 (75).

Até o momento, apesar de estudos imuno-histoquímicos confirmarem a presença de inibidores das proteases, em diferentes regiões do trato genital feminino, não existem estudos que demonstrem a expressão da elafina, no endométrio de mulheres com hidrossalpinge (PUBMED sob os termos *hydrosalpinx AND elafin* Pubmed 1966-2011). Sendo assim, um estudo nessa área é inédito na literatura e poderá agregar mais informações sobre as alterações endometriais 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; 8(3):255-264.
- (2) 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):216-227.

- (3) Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216.
- (4) Savaris RF, Giudice LC. The influence of hydrosalpinx on markers of endometrial receptivity. *Semin Reprod Med* 2007; 25(6):476-482.
- (5) Strandell A, Lindhard A, Waldenstrom U, Thorburn J. Hydrosalpinx and IVF outcome: cumulative results after salpingectomy in a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2001; 16(11):2403-2410.
- (6) Horne AW, Stock SJ, King AE. Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. *Reproduction* 2008; 135(6):739-749.
- (7) 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; 168(2):554-561.
- (8) Sallenave JM. Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2: versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010; 42(6):635-643.
- (9) 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; 340 (Pt 3):569-577.
- (10) Pham CT. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40(6-7):1317-1333.
- (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; 172(12):7791-7803.
- (12) Owen CA. Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2008; 3(2):253-268.
- (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):1246-1272.
- (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; 544(1-3):129-132.
- (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):2891-2905.

- (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; 11(6):733-741.
- (17) Wiedow O, Luademann J, Utecht B. Elafin is a potent inhibitor of proteinase 3. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174(1):6-10.
- (18) 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; 362(10):1369-1375.
- (19) Kramps JA, Klasen EC. Characterization of a low molecular weight anti-elastase isolated from human bronchial secretion. *Exp Lung Res* 1985; 9(1-2):151-165.
- (20) 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; 265(25):14791-14795.
- (21) Saheki T, Ito F, Hagiwara H 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; 185(1):240-245.
- (22) Sallenave JM, Ryle AP. Purification and characterization of elastase-specific inhibitor. Sequence homology with mucus proteinase inhibitor. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1991; 372(1):13-21.
- (23) Jaovisidha K, Etim A, Yamakawa K et al. The serine protease inhibitor trappin-2 is present in cartilage and synovial fluid in osteoarthritis. *J Rheumatol* 2006; 33(2):318-325.
- (24) Pfundt R, van RF, van Vlijmen-Willems IM et al. Constitutive and inducible expression of SKALP/elafin provides anti-elastase defense in human epithelia. *J Clin Invest* 1996; 98(6):1389-1399.
- (25) 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; 59(1):95-101.
- (26) Lee SK, Lee SS, Hirose S et al. Elafin expression in human fetal and adult submandibular glands. *Histochem Cell Biol* 2002; 117(5):423-430.
- (27) Sallenave JM. Antimicrobial activity of antiproteinases. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(2):111-115.

- (28) Fitch PM, Roghanian A, Howie SE, Sallenave JM. Human neutrophil elastase inhibitors in innate and adaptive immunity. *Biochem Soc Trans* 2006; 34(Pt 2):279-282.
- (29) Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM. SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin Sci (Lond)* 2006; 110(1):21-35.
- (30) 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; 265(25):14791-14795.
- (31) 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(9):4426-4431.
- (32) Simpson AJ, Wallace WA, Marsden ME et al. Adenoviral augmentation of elafin protects the lung against acute injury mediated by activated neutrophils and bacterial infection. *J Immunol* 2001; 167(3):1778-1786.
- (33) 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; 452(3):309-313.
- (34) 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; 248(3):904-909.
- (35) McMichael JW, Maxwell AI, Hayashi K 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; 73(6):3609-3617.
- (36) 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; 383(7-8):1249-1256.
- (37) 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; 97(11):2452-2468.
- (38) Henriksen PA, Hitt M, Xing Z 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; 172(7):4535-4544.
- (39) Simpson AJ, Cunningham GA, Porteous DJ, Haslett C, Sallenave JM. Regulation of adenovirus-mediated elafin transgene expression by bacterial lipopolysaccharide. *Hum Gene Ther* 2001; 12(11):1395-1406.

- (40) 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; 71(7):3766-3774.
- (41) 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; 13(5):316-325.
- (42) 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; 32(5):443-452.
- (43) 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; 158(1):256-262.
- (44) Schalkwijk J, van V, I, Alkemade JA, de Jongh GJ. Immunohistochemical localization of SKALP/elafin in psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol* 1993; 100(4):390-393.
- (45) 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; 81(4):907-915.
- (46) King AE, Critchley HO, Kelly RW. Innate immune defences in the human endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:116.
- (47) King AE, Wheelhouse N, Cameron S 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; 24(3):679-686.
- (48) Dalgetty DM, Sallenave JM, Critchley HO et al. Altered secretory leukocyte protease inhibitor expression in the uterine decidua of tubal compared with intrauterine pregnancy. *Hum Reprod* 2008; 23(7):1485-1490.
- (49) 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(12):1125-1134.
- (50) Narvekar N, Lakha F, Critchley HO et al. Changes in vaginal morphology, steroid receptor and natural antimicrobial content following treatment with low-dose mifepristone. *Contraception* 2007; 75(4):271-280.
- (51) Stock SJ, Kelly RW, Riley SC, Calder AA. Natural antimicrobial production by the amnion. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196(3):255-256.

- (52) Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Chapter 15. Reproductive endocrinology. In: Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG, editors. Williams Gynecology. McGraw-Hill Co., 2008.
- (53) King AE, Morgan K, Sallenave JM, Kelly RW. Differential regulation of secretory leukocyte protease inhibitor and elafin by progesterone. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310(2):594-599.
- (54) 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; 143(4):728-732.
- (55) Guyot N, Bergsson G, Butler MW et al. Functional study of elafin cleaved by *Pseudomonas aeruginosa* metalloproteinases. *Biol Chem* 2010; 391(6):705-716.
- (56) Rao NV, Marshall BC, Gray BH, Hoidal JR. Interaction of secretory leukocyte protease inhibitor with proteinase-3. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8(6):612-616.
- (57) Taggart CC, Lowe GJ, Greene CM et al. Cathepsin B, L, and S cleave and inactivate secretory leucoprotease inhibitor. *J Biol Chem* 2001; 276(36):33345-33352.
- (58) Guyot N, Butler MW, McNally P 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; 283(47):32377-32385.
- (59) van WS, van der Linden AC, van Sterkenburg MA et al. Regulation of SLPI and elafin release from bronchial epithelial cells by neutrophil defensins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278(1):L51-L58.
- (60) 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; 90(3):872-875.
- (61) Fleming DC, King AE, Williams AR, Critchley HO, Kelly RW. Hormonal contraception can suppress natural antimicrobial gene transcription in human endometrium. *Fertil Steril* 2003; 79(4):856-863.
- (62) 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; 9(10):1935-1938.
- (63) 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; 66(1):122-125.

- (64) Broeze KA, Opmeer BC, Van GN 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.
- (65) Ajonuma LC, Ng EH, Chan LN et al. Ultrastructural characterization of whole hydrosalpinx from infertile Chinese women. *Cell Biol Int* 2005; 29(10):849-856.
- (66) 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; 8(3):255-264.
- (67) Shaw JL, Wills GS, Lee KF 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; 178(1):253-260.
- (68) Faro S. Chlamydia trachomatis: female pelvic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164(6 Pt 2):1767-1770.
- (69) Barmat LI, Rauch E, Spandorfer S et al. The effect of hydrosalpinges on IVF-ET outcome. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16(7):350-354.
- (70) Meyer WR, Castelbaum AJ, Somkuti S et al. Hydrosalpinges adversely affect markers of endometrial receptivity. *Hum Reprod* 1997; 12(7):1393-1398.
- (71) Strandell A, Lindhard A. Why does hydrosalpinx reduce fertility? The importance of hydrosalpinx fluid. *Hum Reprod* 2002; 17(5):1141-1145.
- (72) Eytan O, Azem F, Gull I, Wolman I, Elad D, Jaffa AJ. The mechanism of hydrosalpinx in embryo implantation. *Hum Reprod* 2001; 16(12):2662-2667.
- (73) Watermeyer SR, Bhal K. Chronic vaginal discharge secondary to a hydrosalpinx. *J Obstet Gynaecol* 2002; 22(3):324.
- (74) Strandell A, Thorburn J, Wallin A. The presence of cytokines and growth factors in hydrosalpingeal fluid. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21(7):241-247.
- (75) 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(4):972-976.

Objetivos

1. Determinar a expressão da elafina no endométrio de mulheres com e sem hidrossalpinge.
2. Quantificar o número de neutrófilos no endométrio de mulheres com e sem hidrossalpinge.

Artigo Original redigido em Inglês

The Influence of hidrosalpinx on endometrial elafin expression

Abstract:

Objective: To determine the expression of elafin, an elastase inhibitor, on the endometrium of women with and without hydrosalpinx.

Design: Case-control study.

Setting: University laboratory research

Patients: Ten normal fertile women (controls) and nine women with hydrosalpinx (cases) diagnosed either by hysterosalpingography or by laparoscopy.

Interventions: Immunohistochemical analysis of elafin on endometrial biopsies obtained during menses, using NIH ImageJ software.

Main outcome measure(s): Intensity of 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) staining on luminal, glandular, stromal and neutrophil endometrium of controls and cases. Pixel intensity varies from 0(dark) to 255(white). Statistical analysis for DAB intensity was done using generalized estimating equations (GEE).

Results: There were no statistical differences between groups when DAB intensity was measured in glands, stroma and neutrophils. The median number of neutrophils was significantly higher in the hydrosalpinx group, compared to controls [7(0-255) vs. 28(1-228); median (range), $P < 0.0001$ – Mann-Whitney test). Elafin expression is reduced in the lumen of endometrium from hydrosalpinx cases [3.9(3.5-4.2)], compared to controls [2.7(2.2-3.2)] [mean (95% CI), $P = 0.0001$ – GEE, lower levels=higher DAB intensity].

Conclusions: The endometrium of women with hydrosalpinx has an increased number of neutrophils and lower expression of elafin. These findings suggest that elastase activity is increased in endometrium of women with hydrosalpinx.

Key Words: Elafin, hydrosalpinx, endometrium

Introduction

The innate immune system (IIS) is an important component of defense against pathogens. Infections of the female reproductive organs can evolve into salpingitis, and eventually lead to infertility (1). A number of mediators and effectors of the IIS are recruited to help resolve the inflammatory process. Activated neutrophils release protease 3 and elastase, which are responsible for destruction of tissue and pathogens, respectively. An over-exuberant, or prolonged, response can result in tissue damage due to proteases (2). However, the host response also includes the production of a number of important anti-proteases, such as the antimicrobials secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and elafin, in order to prevent increased tissue damage to the host (3,4). Elafin (skin-derived antileukoproteinase; elastase-specific inhibitor) is a natural antimicrobial molecule and it is a member of the antileukoproteinase (Trappin) family, also called Trappin-2 (5). Elafin is expressed in human endometrial neutrophils during menstruation. 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 (6). Metalloproteinases (MMP) are key molecules involved in the tissue degradation that occurs at menstruation. Neutrophil elastase activates MMP-2, 3 and 9, and degrades tissue inhibitors of the MMPs (TIMP-1 and TIMP-2) (7). Elafin inhibits neutrophil elastase and proteinase 3 (4). Therefore, it is likely that elafin reduces MMP activity. In addition, elafin mRNA expression is increased by proinflammatory cytokines, such as IL-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) (6), which have been commonly found in hydrosalpinx fluid

(8,9). Levels of SLPI/elafin in vaginal fluid are decreased in women with sexually transmitted disease and bacterial vaginosis (10,11).

Hydrosalpinx, a chronic inflammatory process of the Fallopian tubes resulting from pelvic inflammatory disease, has been shown to have profound repercussions in endometrial receptivity and embryo implantation (12). To date, there are no studies reporting the expression of elafin in the endometrium of women with hydrosalpinx. The aim of this study is to compare the expression and localization of elafin in the endometrium of women with or without hydrosalpinx.

Patients attending the infertility clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) during 2008-2009 with a diagnosis of hydrosalpinx were invited to participate in the study. Hydrosalpinx was diagnosed by hysterosalpingography and/or laparoscopy. Controls were obtained from fertile patients undergoing laparoscopy for tubal ligation. Patients with a diagnosis of endometriosis and those who had used hormones in the last 2 months were excluded.

Human endometrium was obtained with plastic 4mm cannulas (EasyGrip–IPAS–Chapel Hill, NC, USA) during one of the first three days of the menstrual period, at an outpatient clinic. Samples were fixed in 10% buffered formalin for paraffin section. Sections 3 μ m thick were obtained from each paraffin block for Hematoxylin and Eosin (HE) staining and for immunohistochemistry (IHC). For IHC, paraffin sections were deparaffinized, and rehydrated. After a 2x5 min rinse in Phosphate Buffered Saline (PBS), the slides were incubated in citrate buffer at pH 6 and heated in microwaves for 21 minutes at maximum

power. After resting for 15 min, each slide was washed with distilled water twice, followed by a 5 min PBS rinse. Endogenous peroxidase was blocked with 5% H₂O₂ in distilled water 2x15 min. After blocking nonspecific sites with powdered skim milk 5% in PBS for 20 min, the slides were rinsed with distilled water 2x5 min, followed by 5 min rinse in PBS. The slides were then incubated with primary antibody against elafin (Elafin/SKALP Human Mab clone TRAB2F Hycult biotechnology, Uden, The Netherlands) diluted in PBS 1:10, for 1 hour at 22°C in a humid chamber. After a 2x5 min rinse with PBS, the slides were incubated with a secondary antibody (LSAB2, DAKO A/S, Glostrup, Denmark) for 30 min at 22°C in the same chamber. Detection of the primary antibody was performed using the Strepto ABC, LSAB2 system (DAKO) according to the manufacturer's instructions, using diaminobenzidine (DAB) as a chromogen. Diagnosis of chronic endometritis was established by the presence of more than one plasma cell in the stroma in HE slides (13). The negative controls were obtained by carrying out immunostaining without the primary antibody. Known positive specimens were 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 entire specimen on the slide was evaluated by using multiple digital pictures, one microscopic field=one picture. Images were obtained with a 20X objective UPLanFI (resolution: 0.45µm) at a size of 2560 x 1920 pixels (resolution: 1mm = 2950 pixels), under standard lighting conditions. Each slide was coded and blindly analyzed with image analysis software (ImageJ v1.43j; National Institutes of Health, Bethesda, MD). The analytical procedure was written as built in "plugin" from color deconvolution (14). For DAB analysis, the Hematoxylin and DAB built-in vector (HDAB) was used. After selecting the desired area to be analyzed, the region of interest (ROI manager) was

measured by the software, yielding the area in pixels and the mean intensity of the DAB immunostaining from the ROI. The mean DAB intensity varied from 0 (dark brown) to 255 (white). The final balanced DAB intensity was calculated according to the following formula: $(a \times i)/A$, where a =area derived from the ROI in one picture from a sample, A =total area in the group, i = mean DAB intensity.

The study was approved by the ethics committee of HCPA. Sample size was calculated based on the following parameters: an $\alpha=0.05$, power=0.8, an estimate variance of elafin between 0.5~1, and a difference to be found of 1 point in a scale ranging from 0-255. These figures yielded a sample size between 4 and 16 cases in each group.

The generalized estimating equations (GEE) method was used to compare the expression of elafin across the different parts of the endometrium. GEE statistical analysis was performed with PASW Statistics 18 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Non-parametric and parametric data were analyzed with Mann-Whitney U test and Student t test, respectively, using GraphPad InStat version 3.0a for Macintosh, GraphPad Software, San Diego, California, USA.

Nineteen samples were obtained (9 hydrosalpinges; 10 controls). Characteristics of the sample and the mean area per field (in pixels) of stroma, glands, lumen and neutrophils in both groups, and their respective DAB intensity are depicted in Table 1. One case with hydrosalpinx had pelvic pain, the remainder were asymptomatic. The unilaterality or bilaterality of hydrosalpinx did not affect elafin expression (data not shown). Elafin expression in neutrophils, glands and stroma was not significantly different between

groups. Similar findings were reported by King *et al*, who demonstrated that human endometrium is a rich source of elafin during menstruation (6). King *et al* did not evaluate in detail the expression of elafin across the different compartments of the endometrium, i.e. glands, stroma, lumen, neutrophils. In our study, hydrosalpinx cases had a significantly higher area of neutrophils, compared to normal controls (Table 1). This was confirmed by the median number of neutrophils/field in controls [7(0-255)], compared to cases [28(1-228)], which was statistically significant [numbers are median (range); $P < 0.0001$, Mann-Whitney]. The lumen from endometrium of hydrosalpinx subjects had a significantly reduced expression of elafin, compared to controls ($P = 0.0001$, GEE). While the former is not a new finding (15), the latter is.

Neutrophils infiltrate the endometrium around menstruation and they are related to the tissue degradation and repair process (6). The increased number of neutrophils may be related to the inflammatory process derived from the hydrosalpinx, and this finding may explain the detrimental influence of hydrosalpinges on fertility (16). The lower expression of elafin in lumen from hydrosalpinx subjects could be derived from higher neutrophil and protease activity in luminal endometrium. Another explanation for this reduction could be related to an imbalance of elastase activity and its inhibitor, i.e. elafin (17), but we acknowledge that actual elastase activity should be measured to support this hypothesis.

In acute inflammation, there is an increase of elafin expression (18, 19); however, neutrophil elastase in excess, derived from high influx of neutrophils, cleaves elafin (20), and this cleavage may alter its immunomodulatory property. The reduced expression of elafin in the presence of hydrosalpinx may explain the increased risk of recurrent infection

in those subjects who were previously treated for pelvic inflammatory disease (21).

Therefore, it is reasonable to suggest that our findings in luminal endometrium are due to elafin consumption, since no statistical difference between groups was identified in elafin expression in neutrophils (Table 1).

One strength of the study is the use of the software ImageJ to measure DAB intensity. This method reduces subjectivity, inter- and intra-variability of the results. Furthermore, the whole histological sample on each slide was analyzed, and all neutrophils of the samples were analyzed by the software, yielding a more robust result. Multiple pictures were obtained from the same sample, forming them into a cluster, thus GEE analysis is adequate, because the observations were dependent on the cluster (22).

In conclusion, we were able to demonstrate that the epithelial lining of the endometrium of women with hydrosalpinx has a reduced expression of elafin and a higher concentration of neutrophils compared to fertile controls. Future studies may verify whether the use of human recombinant elafin could be used as an adjuvant therapy to prevent sequelae from mild pelvic inflammatory disease.

References

1. Soper DE. Pelvic inflammatory disease. *Obstet Gynecol* 2010;116:419-28.
2. Dallegri F, Ottonello L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm Res* 1997;46:382-91.

3. Sallenave JM. The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase-specific inhibitor/skin-derived antileukoprotease) as alarm antiproteases in inflammatory lung disease. *Respir Res* 2000;1:87-92.
4. 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;23:1485-90.
5. 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;275:2008-20.
6. 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;88:4426-31.
7. 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.
8. Strandell A, Thorburn J, Wallin A. The presence of cytokines and growth factors in hydrosalpingeal fluid. *J Assist Reprod Genet* 2004;21:241-7.
9. Sung L, Copperman AB, Goldstein M, Lapinski R, Bustillo M, Mukherjee T. Characterization of cytokines (IL-1a, IL-1b, OL-8, and TNFa) in human hydrosalpinx fluid: a potential mechanism. *Fertil Steril* 1997;Suppl 1:S78.
10. Draper DL, Landers DV, Krohn MA, Hillier SL, Wiesenfeld HC, Heine RP. Levels of vaginal secretory leukocyte protease inhibitor are decreased in women with lower reproductive tract infections. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1243-8.

11. 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;16:1125-34.
12. Savaris RF, Giudice LC. The influence of hydrosalpinx on markers of endometrial receptivity. *Semin Reprod Med* 2007;25:476-82.
13. Smith M, Hagerty KA, Skipper B, Bocklage T. Chronic endometritis: a combined histopathologic and clinical review of cases from 2002 to 2007. *Int J Gynecol Pathol* 2010;29:44-50.
14. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 2001;23:291-9.
15. 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;86:972-6.
16. The influence of hydrosalpinx on IVF and embryo transfer: a review. *Hum Reprod Update* 2000;6:387-95.
17. Ying QL, Simon SR. Kinetics of the inhibition of human leukocyte elastase by elafin, a 6-kilodalton elastase-specific inhibitor from human skin. *Biochemistry* 1993;32:1866-74.
18. 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;24:679-86.

19. 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;33:318-25.
20. 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;283:32377-85.
21. Trent M, Chung SE, Forrest L, Ellen JM. Subsequent sexually transmitted infection after outpatient treatment of pelvic inflammatory disease. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2008;162:1022-5.
22. Hanley JA, Negassa A, Edwardes MD, Forrester JE. Statistical analysis of correlated data using generalized estimating equations: an orientation. *Am J Epidemiol* 2003;157:364-75.

Table 1. Characteristics of the sample and Results

Characteristics	Controls	Hydrosalpinx	<i>P</i>
Clinical aspects			
Age (mean years±SD)	34±5.9	33±4	0.6 ^a
Ethnicity (n)			
Caucasian/Afro-Brazilian	7/3	9/0	0.2 ^b
Uni/bilateral Hydrosalpinx(n)	0/0	6/3	
Chronic endometritis yes/no	8/2	8/1	1 ^b
Area (pixels/field) ^c			
Stroma	1.7x10 ⁶ ± 1.1 x10 ⁶ [740,374,090 - 223]	1.8x10 ⁶ ± 1.2x10 ⁶ [357,225,324 - 196]	0.3 ^a
Glands	4.4x10 ⁵ ± 3.8 x10 ⁵ [173,974,801 - 201]	4.3x10 ⁵ ± 3.7 x10 ⁵ [83,848,010 - 192]	0.7 ^a
Lumen	1.8x10 ⁵ ± 1.15 x10 ⁵ [23,298,873 - 73]	2x10 ⁵ ±9.9x10 ⁴ [10,082,576 - 50]	0.2 ^a
Neutrophils	7844±12899 [1,614,095 - 204]	13226.9±14126.1 [2,566,023 - 194]	0.00008 ^d
Elafin expression			
Stroma	0.6 [0.4 – 0.9]	1 [0.7 – 1.3]	0.1 ^e
Glands	0.6 [0.4 – 0.9]	1 [0.7 – 1.3]	0.1 ^e
Lumen	2.7 [2.2 – 3.2]	3.9 [3.5 – 4.2]	0.0001 ^e
Neutrophils	1.1 [0.3 – 2]	0.7 [0.3 – 1.1]	0.3 ^e

^a Student *t*-test

^b Fisher's exact test

^c numbers are mean \pm SD and [total area in the group - n of fields]

^d Mann-Whitney U-test

^e Generalized Estimating Equations – numbers are mean [lower and upper 95% Wald confidence interval]

Figure Legends

Table 1. Total and mean area in pixels of different components of endometrium of normal fertile controls (n=9) and cases of hydrosalpinx (n=10).

Artigo Original redigido em Português

A influência da hidrossalpinge na expressão da elafina endometrial

Resumo

Objetivo: determinar a expressão da elafina, um inibidor da elastase, sobre o endométrio de mulheres com e sem hidrossalpinge.

Design: estudo caso-controle.

Local: Laboratório universitário de pesquisa

Pacientes: Dez mulheres normais em idade fértil (controles) e nove mulheres com hidrossalpinge (casos) diagnosticados por histerossalpingografia ou por laparoscopia.

Intervenções: análise de imuno-histoquímica da elafina em biópsias endometriais obtidas durante a menstruação, usando o software ImageJ do NIH.

Principal medida do(s) desfecho(s): Intensidade da coloração do 3,3'-diaminobenzidina (DAB) nos neutrófilos e na porção luminal, glandular, do estroma do endométrio dos controles e casos. A intensidade do pixel variava de 0 (escuro) a 255 (branco). A análise estatística para a intensidade do DAB foi feita por meio do teste equações de estimação generalizadas (GEE).

Resultados: Não houve diferença estatística entre os grupos quando a intensidade do DAB foi medida em glândulas estroma e neutrófilos. A mediana do número de neutrófilos foi significativamente maior no grupo de hidrossalpinge, comparadas com controles [7 (0-255) vs 28 (1-228) e mediana (intervalo), $P < 0,0001$ - teste de Mann-Whitney). A expressão da Elafina está reduzida no lúmen do endométrio em casos de hidrossalpinge [3,9 (3,5-4,2)],

quando comparadas com controles [2,7 (2,2-3,2)] [média (IC 95%), P = 0,0001 - GEE, níveis mais baixos = maior intensidade do DAB].

Conclusões: O endométrio de mulheres com hidrossalpinge tem um aumento do número de neutrófilos e menor expressão da elafina. Estes achados sugerem que a atividade da elastase esteja aumentada no endométrio de mulheres com hidrossalpinge.

Palavras-chave: Elafina, hidrossalpinge, endométrio

Introdução

O sistema imunológico inato é um componente importante da defesa contra patógenos que atacam o trato reprodutivo feminino, o qual é a principal entrada para doenças sexualmente transmissíveis e outras infecções. As infecções e a inflamação dos órgãos reprodutivos femininos podem evoluir para endometrite ou salpingite e, por fim, levar à infertilidade (1). Um número de mediadores e efetores do SII são recrutados para ajudar a resolver o processo inflamatório. Os neutrófilos ativados liberam protease 3 e elastase, os quais são responsáveis pela destruição de tecido e de agentes patogênicos, respectivamente. Uma resposta excessiva ou prolongada pode resultar em danos nos tecidos devido a proteases (2). No entanto, a resposta do hospedeiro também inclui a produção de uma série de importantes anti-proteases, como o inibidor da protease de leucócitos secretores de antimicrobianos (SLPI - *antimicrobials secretory leukocyte protease inhibitor*) e a elafina, a fim de evitar maior dano tecidual ao hospedeiro (3,4). A elafina (*skin-derived antileukoProteínase; elastase-specific inhibitor*) é uma molécula antimicrobiana natural e faz parte da família das antileuco Proteínases (Trappin), também chamada Trappin-2 (5). A

sua função está relacionada à defesa inata da mucosa, que previne a infecção uterina, e o mecanismo anti-proteolítico que regula a menstruação e o reparo tecidual (6). As metaloproteinases (MMP) são as moléculas chaves na degradação tecidual que ocorre na menstruação. A elastase secretada pelos neutrófilos ativa a MMP 2,3 e 9 e degradam os inibidores teciduais das MMPs (TIMP-1 e TIMP-2) (7). A elafina inibe a elastase dos neutrófilos e a proteinase 3 (4). Portanto é provável que a elafina reduz a atividade das MMPs. Além disso, a expressão do mRNA é aumentada pelas citocinas pró-inflamação, tais como a IL-1 β e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) (6), os quais tem sido comumente encontradas no fluido das hidrossalpinges (8, 9). Os níveis de SLPI/elafina na secreção vaginal estão diminuídos nas mulheres com doença sexualmente transmissíveis e com vaginose bacteriana (10,11).

A hidrossalpinge, um processo inflamatório crônico das trompas de Falópio resultante da doença inflamatória pélvica, têm profundas repercussões na receptividade do endométrio e na implantação do embrião (12). Não existem na literatura estudos relacionando a expressão da elafina no endométrio de mulheres com hidrossalpinge. O objetivo deste estudo é comparar a expressão e a localização da elafina entre o endométrio de mulheres com ou sem hidrossalpinge.

Material e Métodos

Pacientes atendidas no ambulatório de infertilidade do Hospital de Clínicas de Porto Alegre durante os anos de 2008-2009, com um diagnóstico de hidrossalpinge foram convidados a

participar do estudo. A hidrossalpinge foi diagnosticada por meio da histerossalpingografia e / ou laparoscopia. Os controles foram obtidos de pacientes férteis submetidas à laparoscopia para realização da laqueadura tubária.

Pacientes com diagnóstico de endometriose e aquelas que estavam usando hormônios nos últimos 2 meses foram excluídas.

As biópsias de endométrio humano foram obtidas através de cânulas de plástico de 4 milímetros (EasyGrip - IPAS -Chapel Hill, NC, EUA), durante um dos três primeiros dias do período menstrual, no ambulatório, sem anestesia. As amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10% para a seção de parafina.

Imuno-histoquímica

Cortes com 3 µm de espessura foram obtidos de cada bloco de parafina, para coloração Hematoxilina e Eosina (HE) e para imuno-histoquímica (IHC). Para IHC, os cortes em parafina foram desparafinizados e reidratados. Após 5 minutos em solução salina com tampão fosfato (PBS), as lâminas foram incubadas em solução tampão de citrato em pH 6 e aquecida em forno de microondas por 21 minutos em potência máxima. Depois de descansar por 15 minutos a 22°C, cada lâmina foi lavada duas vezes com água destilada, seguido de enxágue durante 5 min em PBS. A peroxidase endógena foi bloqueada com H₂O₂ a 5% em água destilada, 2x15 min. Depois de bloquear os sítios inespecíficos com leite em pó desnatado a 5% em PBS por 20 min, as lâminas foram lavadas com água destilada, duas vezes durante 5 min; a seguir as lâminas foram lavadas por 5 min em PBS. O anticorpo primário contra Elafina (Elafina / Skalp Humanos clone Mab TRAB2F Hycult

biotecnologia, Uden, Holanda) diluído em PBS 1:10, foi incubado por uma hora a 22°C em câmara úmida. Depois de lavar as lâminas em PBS por duas vezes durante 5 minutos, o anticorpo secundário (LSAB2, DAKO A / S, Glostrup, Dinamarca) foi incubado por 30 minutos a 22°C, na mesma câmara. A detecção do anticorpo primário foi obtida através do Strepto ABC, sistema LSAB2 (DAKO) de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. O diagnóstico de endometrite crônica foi determinado com a presença de mais de uma célula plasmática no estroma em nas lâminas coradas com HE (13). Os controles negativos foram obtidos com a realização da imunocoloração sem o anticorpo primário. As lâminas sabidamente positivas foram utilizadas como controles externos.

Análise da Imagem

As imagens coradas foram analisadas com um microscópio Olympus BX51 (Olympus Optical Co., Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera digital a cores / Q-Color 5 (Olympus). Múltiplas imagens digitais foram obtidas a partir da amostra total no slide, sendo que um campo microscópico = uma imagem. As imagens foram obtidas com uma lente objetiva de x20 UPLanFI (Resolução: 0,45) com um tamanho de 2560 x 1920 pixels (resolução: 1mm = 2950 pixels), sob condições padronizadas de iluminação. Cada lâmina foi codificada e analisada cegamente através do programa de análise de imagens (ImageJ v1.43j; National Institutes of Health, Bethesda, MD). O procedimento analítico foi escrito como construído em "plugin" para “*color deconvolution*”. A deconvolução é um macro baseado no National Institute of Health (NIH) gentilmente cedido por A. C. Ruifrok (14). Para análise do DAB, o vetor interno construído no software para hematoxilina e DAB (HDAB) foi utilizado.

Após selecionar a área desejada a ser analisada, a região de interesse (ROI *manager*) era medida pelo software, com isso era calculada a área em pixels e a intensidade média da imunocoloração com DAB a partir da ROI. A intensidade média do DAB variava de 0 (marrom escuro) a 255 (branco). A intensidade final balanceada do DAB foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $(a \times i) / A$, onde a = área derivada da ROI em uma imagem a partir de uma amostra, A = área total do grupo estudado, e “ i ”=intensidade média do DAB identificada pelo software.

Comitê de Ética e análise estatística

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O tamanho da amostra foi calculado com base nos seguintes parâmetros: um erro alfa de 0,05, um poder de 0,8; uma estimativa da variância para a elafina entre 0.5 ~ 1 e uma diferença a ser encontrada de 1 ponto, em uma escala que variava de 0 a 255. Esses números evidenciaram um tamanho de amostra entre 4 e 16 casos em cada grupo.

A equação de estimativa generalizada (GEE) foi o método utilizado para comparar a expressão da elafina em diferentes partes do endométrio. A análise estatística da GEE foi realizada com o PASW Statistics 18 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). Os dados não-paramétricos e paramétricos foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney e pelo teste- t de Student, respectivamente, utilizando GraphPad InStat versão 3.0a para Macintosh, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA.

Resultados e Discussão

Dezenove amostras foram obtidas (9 casos de hidrossalpinge e 10 controles).

Características das amostras e média da área por campo (pixels) do estroma, glândulas, lúmen e neutrófilos em ambos os grupos, e a respectiva intensidade DAB estão descritos na Tabela 1. Um caso de hidrossalpinge possuía dor pélvica, as demais se encontravam assintomáticas. A uni ou bilateralidade da hidrossalpinge não afetaram a expressão de elafina (dados não apresentados). A expressão de elafina nos neutrófilos, glândulas e estroma não foi significativamente diferente entre os dois grupos. Achados semelhantes foram reportados por King *et al*, que demonstraram ser o endométrio uma rica fonte de elafina durante a menstruação(6). King *et al* não avaliou em detalhe a expressão da elafina entre os diferentes compartimentos do endométrio, i.e. glândulas, estroma, lúmen e neutrófilos. Na nossa amostra, os casos com hidrossalpinge apresentaram uma área significativa maior de neutrófilos, quando comparados com os controles (Tabela 1). Isso foi confirmado pela mediana do número de neutrófilos/campo nos controles [7(0-255)], quando comparado com casos [28(1-228)], os quais foram estatisticamente significantes [números são as mediana (intervalo); $P < 0.0001$, Mann-Whitney]. O lúmen do endométrio das pacientes com hidrossalpinge apresentou uma redução significativa na expressão de elafina, quando comparado aos controles ($P = 0.0001$, GGE). Embora o primeiro achado não se trate de um achado novo (15), a segunda observação é.

Os neutrófilos infiltram o endométrio durante a menstruação e estão relacionados com a degradação tecidual e o processo de reparação (6). O número aumentado de neutrófilos pode estar relacionado ao processo inflamatório proveniente da hidrossalpinge e este

achado pode explicar a influência deletéria das hidrossalpinges na fertilidade (16) . A baixa expressão de elafina no lúmen das pacientes com hidrossalpinge pode ser devida ao aumento da atividade dos neutrófilos e das proteases no lúmen endometrial. Outra explicação para essa redução pode estar relacionada ao desequilíbrio da atividade da elastase e do seu inibidor, i.e. elafina (17), mas reconhecemos que para confirmar essa hipótese a medida da atividade da elastase deveria ser medida.

Nos processos inflamatórios agudos, existe um aumento da expressão de elafina (18, 19); entretanto, a elastase neutrofílica em excesso, derivada de um influxo aumentado de neutrófilos, cliva a elafina (20), e essa clivagem pode alterar a sua propriedade imunomoduladora. A expressão reduzida da elafina na presença da hidrossalpinge pode explicar o risco aumentado de infecções recorrentes nas mulheres que foram tratadas previamente para doença inflamatória pélvica (21). Portanto, é razoável sugerir que nossos achados no endométrio luminal ocorrem devido ao consumo da elafina, uma vez que não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entres os grupos na expressão da elafina nos neutrófilos (Tabela 1).

Um aspecto positivo do estudo foi o uso do *software* Image J para medir a intensidade do DAB. Este método reduz a subjetividade e a variabilidade inter e intra-observador. Além disso, a análise de toda a amostra histológica em cada lâmina e todos os neutrófilos das amostras foram realizadas pelo software, tornando os resultados mais robustos. Múltiplas imagens foram obtidas da mesma lâmina, formando dessa forma grupos (*clusters*), portanto a análise com GEE está adequada, pois as observações foram dependentes dos clusters (22).

Em conclusão, fomos capazes de demonstrar que os epitélios dos endométrios de mulheres com hidrossalpinge possuem uma expressão reduzida de elafina e uma concentração maior de neutrófilos, quando comparados com controles férteis. Estudos futuros podem verificar se a utilização de elafina recombinante pode ser uma opção como terapia adjuvante na prevenção de sequelas da doença inflamatória pélvica leve.

Referências

1. Soper DE. Pelvic inflammatory disease. *Obstet Gynecol* 2010;116:419-28.
2. Dallegri F, Ottonello L. Tissue injury in neutrophilic inflammation. *Inflamm Res* 1997;46:382-91.
3. Sallenave JM. The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase-specific inhibitor/skin-derived antileukoprotease) as alarm antiproteases in inflammatory lung disease. *Respir Res* 2000;1:87-92.
4. 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;23:1485-90.
5. 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;275:2008-20.
6. 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;88:4426-31.

7. 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.
8. Strandell A, Thorburn J, Wallin A. The presence of cytokines and growth factors in hydrosalpingeal fluid. *J Assist Reprod Genet* 2004;21:241-7.
9. Sung L, Copperman AB, Goldstein M, Lapinski R, Bustillo M, Mukherjee T. Characterization of cytokines (IL-1a, IL-1b, OL-8, and TNFa) in human hydrosalpinx fluid: a potential mechanism. *Fertil Steril* 1997;Suppl 1:S78.
10. Draper DL, Landers DV, Krohn MA, Hillier SL, Wiesenfeld HC, Heine RP. Levels of vaginal secretory leukocyte protease inhibitor are decreased in women with lower reproductive tract infections. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1243-8.
11. 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;16:1125-34.
12. Savaris RF, Giudice LC. The influence of hydrosalpinx on markers of endometrial receptivity. *Semin Reprod Med* 2007;25:476-82.
13. Smith M, Hagerty KA, Skipper B, Bocklage T. Chronic endometritis: a combined histopathologic and clinical review of cases from 2002 to 2007. *Int J Gynecol Pathol* 2010;29:44-50.
14. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 2001;23:291-9.

15. 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;86:972-6.
16. The influence of hydrosalpinx on IVF and embryo transfer: a review. *Hum Reprod Update* 2000;6:387-95.
17. Ying QL, Simon SR. Kinetics of the inhibition of human leukocyte elastase by elafin, a 6-kilodalton elastase-specific inhibitor from human skin. *Biochemistry* 1993;32:1866-74.
18. 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;24:679-86.
19. 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;33:318-25.
20. 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;283:32377-85.
21. Trent M, Chung SE, Forrest L, Ellen JM. Subsequent sexually transmitted infection after outpatient treatment of pelvic inflammatory disease. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2008;162:1022-5.

22. Hanley JA, Negassa A, Edwardes MD, Forrester JE. Statistical analysis of correlated data using generalized estimating equations: an orientation. *Am J Epidemiol* 2003;157:364-75.

Tabela 1. Características da amostra e Resultados:

Características	Controles	Hidrossalpinge	<i>P</i>
Aspectos Clínicos			
Idade (média anos±DP)	34±5.9	33±4	0.6 ^a
Etínias(n)			
Caucasianos/Afro-Brasileiros	7/3	9/0	0.2 ^b
Uni/bilateral Hidrosalpinge (<i>n</i>)	0/0	6/3	
Endometrite crônica sim/não	8/2	8/1	1 ^b
Área (pixels/campo) ^c			
Estroma	1.7x10 ⁶ ± 1.1 x10 ⁶ [740,374,090 - 223]	1.8x10 ⁶ ± 1.2x10 ⁶ [357,225,324 - 196]	0.3 ^a
Glândulas	4.4x10 ⁵ ± 3.8 x10 ⁵ [173,974,801 - 201]	4.3x10 ⁵ ± 3.7 x10 ⁵ [83,848,010 - 192]	0.7 ^a
Lúmen	1.8x10 ⁵ ± 1.15 x10 ⁵ [23,298,873 - 73]	2x10 ⁵ ±9.9x10 ⁴ [10,082,576 - 50]	0.2 ^a
Neutrófilos	7844±12899 [1,614,095 - 204]	13226.9±14126.1 [2,566,023 - 194]	0.00008 ^d
Expressão Elafina			
Estroma	0.6 [0.4 – 0.9]	1 [0.7 – 1.3]	0.1 ^e
Glândulas	0.6 [0.4 – 0.9]	1 [0.7 – 1.3]	0.1 ^e
Lúmen	2.7 [2.2 – 3.2]	3.9 [3.5 – 4.2]	0.0001 ^e
Neutrófilos	1.1 [0.3 – 2]	0.7 [0.3 – 1.1]	0.3 ^e

^a Teste *t* de Student

^b Teste exato de Fisher's

^c números são média±DP e [área total no grupo - *n de campos*]

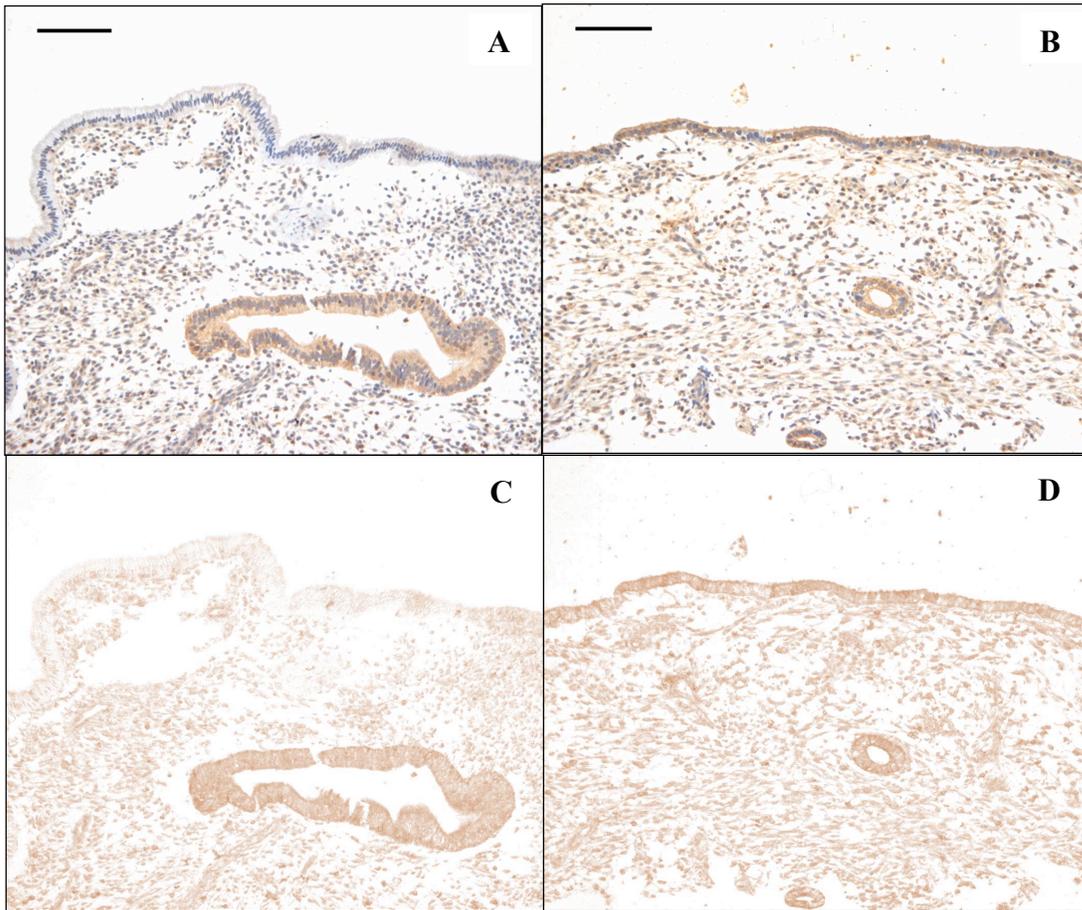
^d Teste U de Mann-Whitney

^e Generalized Estimating Equations – números são média[inferior e superior 95% Intervalo de confiança de Wald]

Legenda das figuras

Tabela 1. Área total e média em pixels dos diferentes componentes do endométrio de controles férteis normais (n=9) e nos casos de hidrossalpinge (n=10).

Anexo 1. Fotos ImageJ



Exemplo da expressão da elafina no lúmen de mulheres com hidrossalpinge (A) e controles (B). Note a fraca expressão da elafina no lúmen no caso de hidrossalpoinge, após a deconvolução de cor (C), quando comparada com o controle (D). A barra representa uma escala de 50 μ m.

Anexo 2 – Aceite do manuscrito na revista Fertility and Sterility

From: "Fertil Steril" <Fertstert@asrm.org>
Subject: **Your Submission, F and S10741R1**
Date: January 25, 2011 3:42:00 PM GMT-02:00
To: rsavaris@hcpa.ufrgs.br

Ref.: Ms. No. F and S10741R1
The influence of hydrosalpinx on endometrial elafin expression

Dear Dr. Savaris,

I am pleased to inform you that the above-mentioned manuscript has been accepted for publication in Fertility and Sterility.

Accordingly, your manuscript will now be transmitted to production for copy editing. You should receive your galley proof in about 4 weeks. Please review the galley and answer the copy editor's queries.

Thank you again for submitting your manuscript to Fertility and Sterility.

Sincerely,

Alan H. DeCherney, M.D.
Editor-in-Chief

Reviewers' comments:

Reviewer #2: The paper as been modified according to the criticisms. I think that the paper can be accepted.