

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA**

**EXPRESSÃO GÊNICA DE *bcl2*, RECEPTOR DE ESTRADIOL E RECEPTORES  
DE PROGESTERONA A E B EM ENDOMÉTRIO EUTÓPICO E ECTÓPICO DE  
PACIENTES INFÉRTEIS SEM E COM ENDOMETRIOSE**

***Sheila Bünecker Lecke***

**Orientadora: Profa. Dra. Poli Mara Spritzer**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Débora Martinho Morsch**

**Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia.**

**Porto Alegre, 2006.**

***Dedico esta dissertação ao Prof. Dr. Geraldo Attilio D'Carli.  
Muito obrigada, professor, por ter me contagiado com o  
seu entusiasmo pela vida acadêmica e científica.***

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus.

Agradeço a minha família pelo estímulo e apoio constantes, pela confiança, pela amizade e pelo amor. Pai e mãe, obrigada pelo exemplo de vida.

Agradeço ao meu amor, Cristiano, por estar sempre presente. Obrigada pela compreensão e paciência, pela amizade e amor sinceros, e pelo abrigo nas horas difíceis.

Agradeço ao Prof. Dr. Francisco Lhullier pela orientação em busca de meus interesses acadêmicos e pelo constante assessoramento profissional.

Agradeço à Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva pelo estímulo, pela amizade e pelas certas contribuições a este trabalho.

Agradeço às Profa. Dra. Maria Flávia Ribeiro e Profa. Dra. Renata Menezes Rossat pelo meu “amadurecimento acadêmico”.

Agradeço à Profa. Dra. Maria Beatriz Kohek pelo apoio e pela amizade.

Agradeço ao Dr. César Villodre pelo apoio e pela companhia no laboratório.

Agradeço aos professores Adriane Pozzobon e Rafael Bueno Orcy pelo auxílio, pela compreensão e pela amizade ao longo destes anos.

Agradeço aos colegas Ana Luiza Ferrari, Antônio Azambuja Miragem, Lolita Schneider e Vivian Treischel pelo estímulo e pela amizade.

Agradeço ao colega e amigo Vanderlei Biolchi pelos estudos de última hora, pela parceria, pelo espírito de garoto sempre buscando um sorriso no meu rosto.

Agradeço, particularmente, à colega e amiga Simone Radavelli pela sincera amizade que criamos a partir desta jornada. Obrigada Simone, além do apoio e do estímulo, pelo carinho e pela disponibilidade sempre singulares.

Agradeço aos alunos Diego Pianta, Gisele Branchini, Gustavo Kich Brondani, Juliana Vieira e Polyana Sartori Maier pelo agradável convívio e pela companhia em muitos experimentos.

Agradeço a Miriam Sant'Helena pela disponibilidade e pela atenção durante este período.

Agradeço a Idelma Oliveira Pithan e Iracema Vera Soares (*in memoriam*) pela incansável dedicação no preparo específico dos materiais para os experimentos e na manutenção do laboratório. Obrigada Idelma, pelo carinho e amizade sinceros.

Agradeço às supervisoras e aos colegas de profissão pela incessante compreensão e pelo apoio no alcance desta jornada. Obrigada, particularmente, ao Prof. Dr. Carlos Franco Voegeli pela oportunidade de dividir minha dedicação entre a atividade profissional e a formação acadêmica de Pós-Graduação, Mestrado.

Agradeço aos responsáveis pela Unidade de Reprodução Humana do Hospital de Clínicas de Minas Gerais e ao Instituto Biocor do Brasil que possibilitaram a coleta de material, imprescindível para realização deste trabalho. Outrossim, à equipe da Unidade de Reprodução Humana do Hospital de Clínicas de Minas Gerais que realizou a extração e quantificação do RNA total destas amostras.

Agradeço à coordenação e à comissão do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia pela atenção, pelo auxílio e pela disponibilidade demonstrados.

Agradeço pelo privilégio de realizar minha formação de Pós-Graduação, Mestrado, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Finalmente, agradeço a duas pessoas especiais e fundamentais para concretização deste sonho.

Primeiramente, agradeço à Profa. Dra. Poli Mara Spritzer pelo exemplo profissional e humano. Obrigada Dra. Poli Mara, pela intensa dedicação, pela compreensão, pelo estímulo, pela confiança. Agradeço por ter acreditado e apostado em mim, desde o início quando chegada de outra universidade. Obrigada por deixar que sua equipe também se tornasse parte de minha família.

Sou grata também à Profa. Dra. Débora Martinho Morsch, com a qual aprendi várias das técnicas desenvolvidas em nosso laboratório e utilizadas neste projeto. Obrigada Débora, pela amizade sincera, pelo apoio e atenção, pela compreensão nos momentos difíceis e pela alegre convivência. Foi um privilégio ter trabalhado contigo.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	03
RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	09
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE TABELAS.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 O Endométrio.....	17
1.2 O Ciclo Menstrual Feminino.....	18
1.3 A Endometriose.....	22
1.4 A Endometriose como doença multifatorial.....	26
1.4.1 Aspectos Genéticos.....	26
1.4.2 Aspectos Hormonais.....	27
1.4.2.1 Receptores Hormonais.....	30
Receptores de Estrogênio (ER).....	32
Receptores de Progesterona (PR).....	34
1.4.3 Aspectos Imunológicos.....	37
1.4.3.1 <i>B cell lymphoma/leukemia 2 (bcl2)</i> .....	39
1.5 OBJETIVOS.....	41
1.5.1 Objetivo Geral.....	41
1.5.2 Objetivos Específicos.....	41
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
2.1 Delineamento do estudo.....	42
2.2 Obtenção das amostras de tecido endometrial.....	42
2.3 Avaliação da expressão gênica por RT-PCR.....	43
2.3.1 Extração e quantificação do RNA total.....	43
2.3.2 Síntese do cDNA.....	43

2.3.3 Protocolo geral da PCR.....	44
2.4 Padronização das PCR.....	47
2.4.1 Padronização da PCR para <i>PR-A</i> .....	48
2.4.2 Padronização da PCR para <i>PR-B</i> .....	50
2.4.3 Padronização da PCR para $\beta_2m$ (165 pb) .....	52
2.5 Análise Estatística.....	55
2.6 Considerações Éticas.....	55
3 RESULTADOS.....	56
4 DISCUSSÃO.....	64
5 CONCLUSÕES.....	70
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

## RESUMO

A endometriose caracteriza-se pela presença de tecido endometriótico – glândulas e estroma – fora da cavidade uterina. A doença acomete superfícies peritoneais da pélvis, ovários e septo rectovaginal, sendo mais comum a endometriose pélvica. Embora os dados sobre a prevalência exata de endometriose sejam incertos, as evidências indicam uma prevalência em torno de 5 a 10% das mulheres em idade reprodutiva. Dor, dismenorréia, dispareunia e infertilidade são sintomas freqüentes da doença. Além de apresentar dependência aos hormônios sexuais, a endometriose está associada a um conjunto de desordens de diferentes etiologias, sendo considerada uma doença multifatorial de caráter genético e imune. Neste sentido, a carência de respostas imunológicas adequadas, aliada a um provável desequilíbrio entre os processos de proliferação e apoptose celular, pode ter um papel importante na instalação e manutenção das lesões endometrióticas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a expressão de genes relacionados aos processos de proliferação e diferenciação celular em implantes endometrióticos e endométrio eutópico de mulheres inférteis sem e com endometriose, através da análise semiquantitativa por RT-PCR. Foram estudadas 34 pacientes consultando por infertilidade e submetidas à laparoscopia diagnóstica. Quinze pacientes ( $31,7 \pm 1,5$  anos) apresentavam endometriose e 19 ( $32,9 \pm 0,9$  anos) foram consideradas controles inférteis sem endometriose. Os dois grupos apresentaram IMC e SHBG similares. As biópsias de endométrio foram realizadas, em fase folicular, nas pacientes do grupo controle (C) e nas pacientes com endometriose (endométrio eutópico (EUT) e ectópico (ECT)). A presença do mRNA para os receptores de estrogênio e progesterona detectada nos 3 grupos estudados, sustenta a existência de sensibilidade tecidual local aos hormônios sexuais. Nas condições experimentais do presente estudo não foi observada diferença estatística na expressão gênica de *bcl2* entre os grupos. A expressão do gene do *ER $\alpha$*  endometrial também foi similar

entre os grupos controle, eutópico e ectópico. Contudo, o endométrio ectópico apresentou níveis de mRNA mais elevados para *PR-A* ( $0,84 \pm 0,02$  UA) em relação aos grupos controle e eutópico ( $0,60 \pm 0,04$  UA e  $0,63 \pm 0,04$  UA;  $p < 0,05$ ). A expressão gênica do *PR-B* não foi estatisticamente diferente entre os grupos do presente trabalho. Porém, houve forte correlação negativa entre a expressão dos genes *bcl2* e *PR-B* nas amostras de endométrio sem e com endometriose ( $r = -0,795$  e  $p = 0,018$ ), sugerindo que um papel anti-proliferativo do *PR-B* possa ser operativo neste modelo de estudo.



## ABSTRACT

Endometriosis is characterized as the presence of endometrial glands and stroma outside of the uterine cavity. The disorder attacks the surfaces on the pelvic peritoneum, ovaries and rectovaginal septum, been commonly the pelvic endometriosis. Although the exact prevalence remains uncertain, 5 to 10% of women of reproductive age are estimated to have endometriosis. Pain, dysmenorrhea, dyspareunia and infertility are frequent symptoms of the disorder. Endometriosis is a hormonal-dependent disease and has been considered as a multifactorial disorder with genetic and immune characteristics. Thus, changes on immunologic responses associated to a potential disequilibrium between proliferative and apoptotic process, seems to play a main role in the development and maintenance of the endometriotic lesions. The aim of this study was to characterize the expression of genes related to cellular proliferation and differentiation in endometriotic lesions and eutopic endometrium from infertile women with and without endometriosis by RT-PCR semiquantitative analysis. Thirty four patients consulting for infertility and submitted to diagnostic laparoscopy were studied. Fifteen patients ( $31.7 \pm 1.5$  years old) presented endometriosis and 19 ( $32.9 \pm 0.9$  years old) were considered as control, free from the disease. Both groups presented similar BMI and SHBG. Endometrial biopsies were collected during the follicular phase, from patients of the control group (C) and those from the endometriosis group (eutopic (EUT) and ectopic (ECT) endometrium). Estrogen and progesterone receptor gene expression was detected in the 3 groups, supporting the existence of a local sensitivity to sexual hormones. No statistical differences were observed in *bcl2* gene expression between the groups. The gene expression of *ER $\alpha$*  was also similar among control, eutopic and ectopic groups. In turn, ectopic endometrium showed higher *PR-A* gene expression ( $0.84 \pm 0.02$  AU) than control and eutopic groups ( $0.60 \pm 0.04$  AU e  $0.63 \pm 0.04$  AU;  $p < 0.05$ ). The *PR-B* gene expression did not differ among the groups. However, a strong

and significant negative correlation between *bcl2* and *PR-B* levels was demonstrated in the endometrial samples from patients presenting or not endometriosis ( $r = - 0.795$  and  $p = 0.018$ ), suggesting that an anti-proliferative role of *PR-B* could be operating through this model of study.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\beta_2m$	$\beta_2$ -microglobulina
$\mu\text{g}$	Microgramas
$\mu\text{L}$	Microlitros
17 $\beta$ HSD-1	17 $\beta$ -hidroxiesteróide-desidrogenase tipo 1
17 $\beta$ HSD-2	17 $\beta$ -hidroxiesteróide-desidrogenase tipo 2
°C	Graus Celsius
A	Androstenediona
AINES	Antiinflamatórios não esteroidais
AR	Receptor de androgênios
ARO	Aromatase
<i>bcl2</i>	<i>B cell lymphoma/leukemia 2</i>
cDNA	Ácido desoxirribonuclêico complementar
COX-2	Ciclooxigenase-2
dATP	Desoxi adenina trifosfato
dCTP	Desoxi citosina trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
dGTP	Desoxi guanina trifosfato
DO	Densidade óptica
DNA	Ácido desoxirribonuclêico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatos
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Desoxi timidina trifosfato
E <sub>1</sub>	Estrona
E <sub>2</sub>	Estradiol
EBAF	Fator de sangramento endometrial
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EP	Erro padrão da média
ER	Receptor de estrogênios
ER $\alpha$	Receptor de estrogênios subtipo $\alpha$
ER $\beta$	Receptor de estrogênios subtipo $\beta$
ERE	Elemento responsivo ao estrogênio
FSH	Hormônio Folículo-estimulante
GALT	Galactose-1-fosfato-uridiltransferase
GnRH	Hormônio de Liberação das Gonadotropinas
HCl	Ácido clorídrico
HGB	Fator de crescimento de hepatócitos
IMC	Índice de Massa Corporal
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodaltons
LH	Hormônio Luteinizante
M	Molar
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
min.	Minutos
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinase de matriz
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
ng	Nanograma
nm	Nanômetros
P	Progesterona
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PHS	<i>Pos-Hot-Start</i>
PPAR $\gamma$	Receptor $\gamma$ de proliferação dos peroxissomos
PR	Receptor de progesterona
<i>PR-A</i>	Receptor de progesterona subtipo <i>A</i>
<i>PR-B</i>	Receptor de progesterona subtipo <i>B</i>
PRE	Elemento responsivo à progesterona
RCQ	Relação cintura/quadril

RNA	Ácido ribonucléico
RPA	<i>RNAse Protection Assay</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
s	Segundos
SHBG	Proteína Carreadora de Hormônios Esteróides
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
T	Testosterona
U	Unidades
UA	Unidades arbitrárias
V	Volts
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura interna do útero.....	18
Figura 2 – Fases do ciclo menstrual feminino.....	20
Figura 3 – Fórmula química dos principais hormônios esteróides e suas interconversões.....	21
Figura 4 – Imagens de laparoscopia.....	23
Figura 5 – Teoria da menstruação retrógrada.....	26
Figura 6 – Endometriose: atividade local da aromatase e insensibilidade à progesterona.....	28
Figura 7 – Endometriose: inativação defeituosa de estradiol.....	29
Figura 8 – Estruturas esquemáticas dos receptores hormonais ER e PR.....	31
Figura 9 – Representação esquemática dos receptores hormonais ER e PR.....	31
Figura 10 – Homologia entre $ER\alpha$ e $ER\beta$ .....	33
Figura 11 – Estruturas esquemáticas dos receptores hormonais $PR-A$ e $PR-B$ .....	34
Figura 12A – Mecanismo molecular de ação do $PR-B$ e do $PR-A$ .....	36
Figura 12B – Mecanismo molecular de ação do $PR-A$ sobre o $ER\alpha$ .....	36
Figura 13 – Resposta imunológica na endometriose.....	38
Figura 14 – Representação esquemática da amostra.....	43
Figura 15 – Padronização da PCR para determinação dos níveis de mRNA do $PR-A$ em tecido endometrial.....	49
Figura 16 – Padronização da PCR para determinação dos níveis de mRNA do $PR-B$ em tecido endometrial.....	51
Figura 17 – Padronização da PCR para determinação dos níveis de mRNA da $\beta_2m$ (165 pb) em tecido endometrial.....	53
Figura 18 – Padronização da PCR para determinação dos níveis de mRNA da $\beta_2m$ (165 pb) em tecido endometrial.....	54

Figura 19 – Níveis do mRNA de <i>bcl2</i> ( <i>B cell lymphoma/leukemia 2</i> ) avaliados por RT-PCR em tecido endometrial.....	57
Figura 20 – Níveis do mRNA do <i>ER<math>\alpha</math></i> (receptor de estrogênios subtipo $\alpha$ ) avaliados por RT-PCR em tecido endometrial.....	59
Figura 21 – Níveis do mRNA de <i>PR-A</i> (receptor de progesterona isoforma <i>A</i> ) avaliados por RT-PCR em tecido endometrial.....	61
Figura 22 – Níveis do mRNA de <i>PR-B</i> (receptor de progesterona isoforma <i>B</i> ) avaliados por RT-PCR em tecido endometrial.....	62
Figura 23 – Correlação entre a expressão gênica de <i>bcl2</i> e de <i>PR-B</i> .....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo geral da PCR.....	45
Tabela 2 – Lista dos genes utilizados para realização da RT-PCR, seqüência dos <i>primers</i> e tamanho dos fragmentos amplificados (pb).....	46
Tabela 3 – Condições da PCR dos diferentes genes estudados.....	47



## 1 INTRODUÇÃO

Uma das causas mais comuns de infertilidade feminina é a endometriose e o estudo da doença tem sido objeto de grande interesse e pesquisa nos últimos quarenta anos. A endometriose caracteriza-se pela presença de tecido endometriótico fora da cavidade uterina, podendo se manifestar desde a adolescência até a menopausa.

### 1.1 O Endométrio

O endométrio é a camada interna do útero, renovada mensalmente pela menstruação (Figura 1). É formado por epitélio e lâmina própria, contendo glândulas tubulosas simples que, às vezes, ramificam-se em suas porções mais profundas até o miométrio. O epitélio, além de revestir e proteger, secreta um muco de constituição glicoprotéica. O tecido da lâmina própria é rico em células e apresenta grande quantidade de material intercelular amorfo.

Sob ação dos hormônios ovarianos, produzidos por estímulo da hipófise anterior, o endométrio sofre modificações estruturais cíclicas que constituem o ciclo endometrial.



Figura 1 – Estrutura interna do útero. Adaptado de [www.eca.usp.br/nucleos/njr/voxscentiae/img/endo5.jpg](http://www.eca.usp.br/nucleos/njr/voxscentiae/img/endo5.jpg)

## 1.2 O Ciclo Menstrual Feminino

O sistema hormonal feminino é formado pela interação do eixo hipotálamo-hipófise-ovários, responsável pela liberação dos seguintes hormônios:

- Hormônio de Liberação das Gonadotropinas (GnRH): secretado pelos neurônios hipotalâmicos;
- Hormônio Folículo-estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH): hormônios da hipófise anterior, ambos secretados em resposta ao GnRH;
- Hormônios Ovarianos (Estrogênio e Progesterona): secretados pelos ovários em resposta aos dois hormônios hipofisários.

Estes hormônios não são secretados em quantidades constantes por todo o ciclo menstrual feminino. Ocorrem taxas hormonais drasticamente distintas durante as diferentes fases do mesmo.

Na mulher normal não-grávida, os ovários respondem pelo principal sítio de biossíntese estrogênica; apesar de quantidades diminutas serem secretadas pelo córtex das adrenais, tecido adiposo e pele. Destes tecidos extra-ovarianos, especialmente o tecido adiposo e a pele respondem pelos níveis circulantes de estradiol durante supressão ovariana e menopausa. A secreção ovariana de

estrogênios acontece de maneira cíclica, de acordo com as diferentes fases do ciclo menstrual feminino (Figura 2).

À medida que o folículo dominante amadurece, sob influência do FSH, as células de sua camada granulosa se replicam e proliferam, expressando níveis crescentes da enzima aromatase (ARO). A ARO modula a atividade esteroideogênica local, visto que promove a conversão de Androstenediona (A) em Estrona ( $E_1$ ) e de Testosterona (T) em Estradiol ( $E_2$ ). As células da camada externa – teca – dos folículos ovarianos em resposta ao LH, sintetizam os androgênios androstenediona e testosterona a partir do colesterol. Estes androgênios difundem-se para as células da granulosa, onde são biotransformados pela ARO.

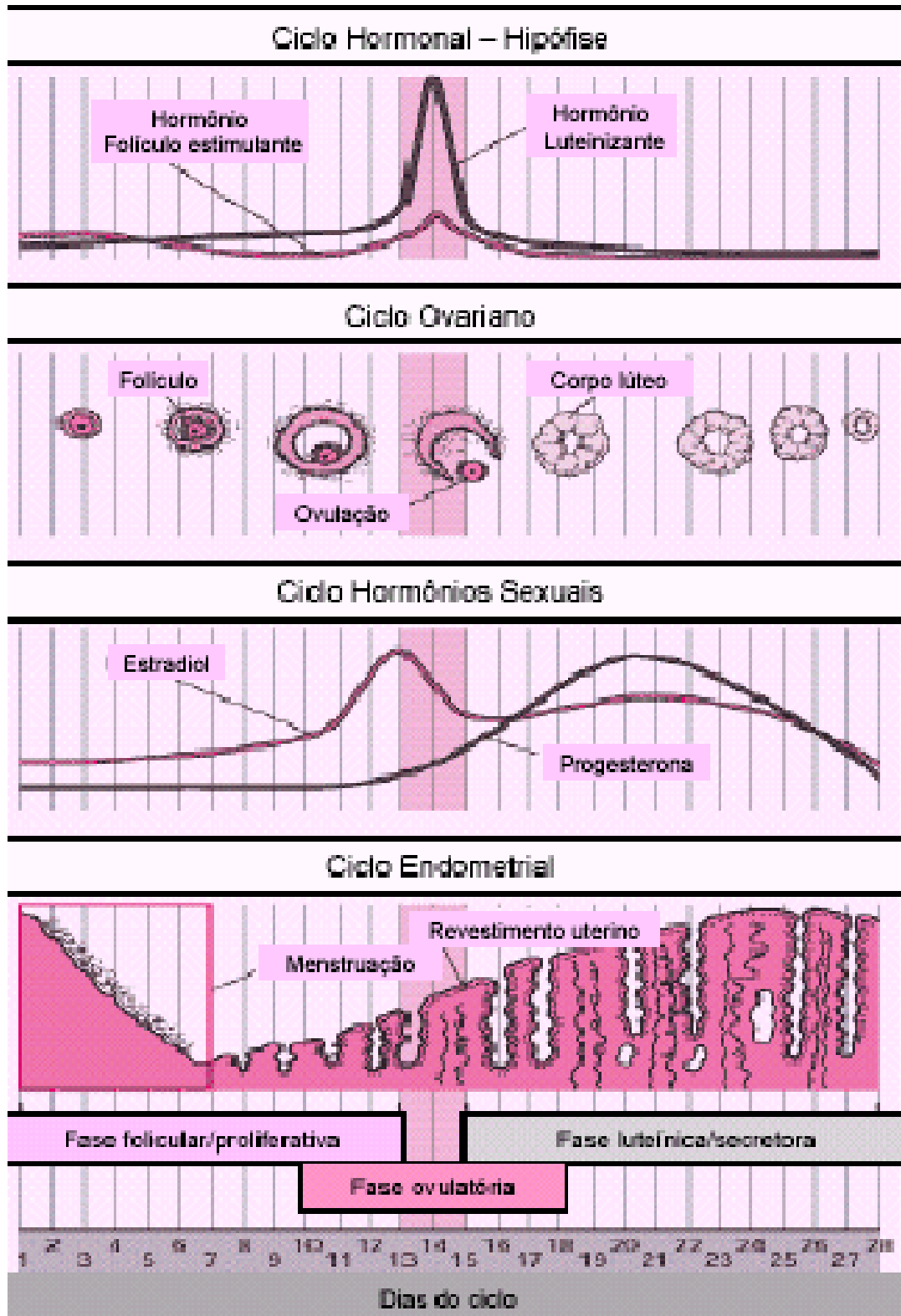


Figura 2 – Fases do ciclo menstrual feminino. Adaptado de [164.41.57.42/node104.html](http://164.41.57.42/node104.html).

Sendo assim, as células da teca contêm o maquinário necessário para síntese de androgênios a partir de colesterol e as da granulosa expressam a ARO, convertendo androgênios em estrogênios (Figura 3). O  $E_2$  é o estrogênio biologicamente ativo. A  $E_1$  por sua vez, é convertida a  $E_2$  pela enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteróide-desidrogenase tipo 1 (17 $\beta$ HSD-1) presente nas células da granulosa.

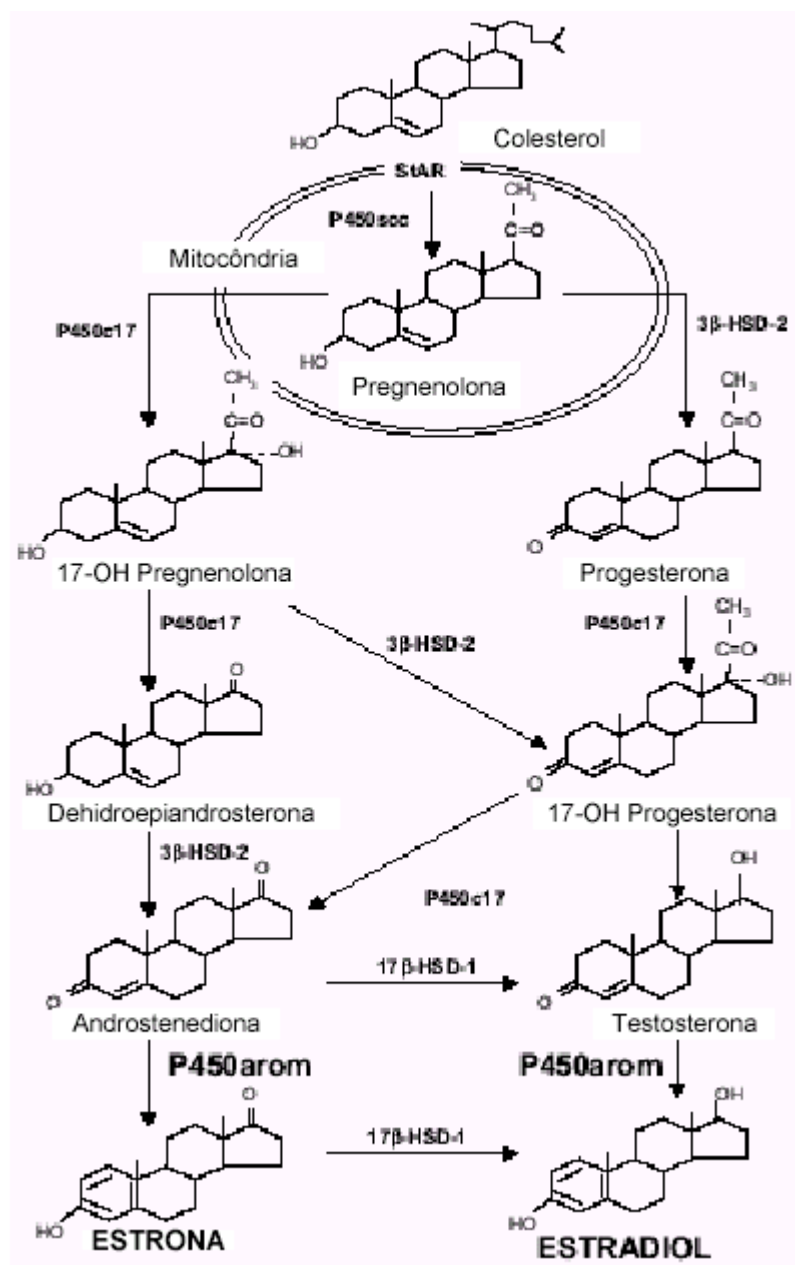


Figura 3 – Fórmula química dos principais hormônios esteróides e suas interconversões. StAR – proteína reguladora da esteroidogênese; P450scc – enzima de clivagem da cadeia lateral; P450c17 – 17 $\alpha$ -hidroxilase; 3 $\beta$ -HSD-2 – 3 $\beta$ -hidroxiesteróide-desidrogensase tipo 2; 17 $\beta$ -HSD-1 – 17 $\beta$ -HSD tipo 1; P450arom – aromatase. Adaptado de Attar & Bulun, 2006.

A progesterona (P) – de longe a mais importante das progestinas – é secretada em quantidades significativas apenas durante a segunda metade do ciclo menstrual feminino, pelo corpo lúteo (Figura 2 – Ciclo Ovariano). O corpo lúteo constitui-se de um remanescente de células da granulosa e da teca após a expulsão do oócito do folículo. A transformação das células da granulosa e da teca em células luteínicas é, sobretudo, dependente do LH, sendo a luteinização das células da granulosa também subordinada à extrusão do oócito.

Os estrogênios são potentes mitógenos para o endométrio, imprescindíveis para manutenção da proliferação celular na primeira fase do ciclo – fase proliferativa. Contrariamente, a progesterona inibe a ação mitogênica do estradiol sobre o endométrio, favorecendo a diferenciação celular característica da segunda fase do ciclo – fase secretora (Gurates & Bulun, 2003) (Figura 2 – Ciclo Endometrial). Estes processos de proliferação e/ou diferenciação celular do endométrio são acompanhados da indução de inúmeras proteínas e/ou citocinas (fatores de crescimento, de transformação e de angiogênese, interleucinas, interferons) que podem atuar de forma sinérgica, ou não, com os esteróides, mediando a ação hormonal sobre a estrutura e a função endometrial. Enquanto os estrogênios atuam como agentes pró-inflamatórios, a progesterona exerce uma potente resposta antiinflamatória (Conneely & Lydon, 2000). De acordo, outros autores indicaram ser a P, uma potente moduladora das respostas inflamatórias, capaz de induzir a expressão de citocinas antiinflamatórias (Davies *et al.*, 2004).

### **1.3 A Endometriose**

A endometriose é caracterizada pela presença de tecido endometriótico – glândulas e estroma – fora da cavidade uterina. A endometriose acomete superfícies peritoneais da pélvis, ovários e septo rectovaginal, sendo mais comum a primeira delas – a endometriose pélvica. Giudice & Kao, 2004 relatam casos raros da patologia em pericárdio, pleura e até mesmo cérebro humano. Apesar de apresentar natureza de tumor maligno pelo fato de crescer, infiltrar-se e aderir-se aos tecidos adjacentes (Kitawaki *et al.*, 2002), histopatologicamente é considerada uma doença benigna.

Dor, dismenorréia, dispareunia e infertilidade são sintomas da doença. O diagnóstico de suspeita da doença é feito através da história clínica, exame ginecológico, ultra-som endovaginal e alguns exames laboratoriais. O diagnóstico confirmatório da patologia, porém, só ocorre pelo exame anatomopatológico da lesão ou biópsia para constatação da presença das lesões vasculares. Este pode ser feito através de cirurgia, laparotomia, ou, preferivelmente, laparoscopia (Scarselli *et al.*, 2005; Ulrich & Keckstein, 2005). A laparoscopia é um procedimento cirúrgico, geralmente realizado com anestesia geral, de exame e manipulação da cavidade abdominal através de instrumentos de ótica e/ou vídeo, bem como de instrumentos cirúrgicos delicados que são introduzidos através de pequenos orifícios no abdômen.

Para finalidades didáticas, a endometriose foi classificada em graus de I a IV. Porém na prática, verifica-se que estes graus não refletem obrigatoriamente a gravidade da doença ou suas chances de tratamento. Basicamente existem três tipos distintos de lesões: as vermelhas, as escuras e as brancas. As primeiras constituem os implantes endometrióticos mais recentes, onde é nítida a presença de um endométrio funcionando, cíclico e ativo. As lesões escuras são áreas inflamatórias em processos de remodelamento e necrose celular, onde há acúmulo de debris e hemossiderina. As lesões brancas são as mais antigas, já densas e fibrinosas (Figura 4).

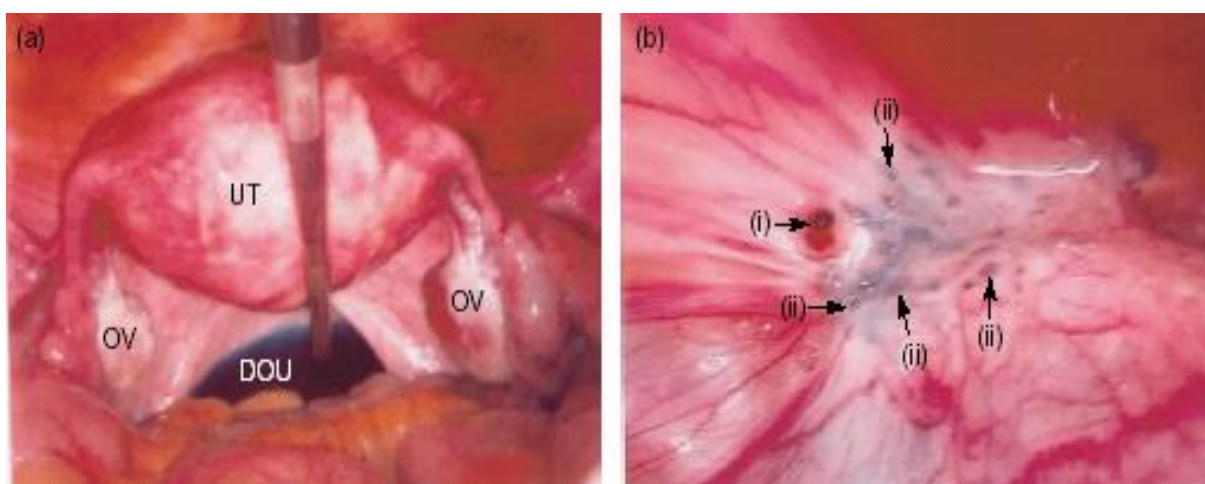


Figura 4- Imagens de laparoscopia. (a) pélvis normal: OV – ovário; UT – útero; (b) múltiplas lesões endometrióticas no peritônio: (i) lesões vermelhas, (ii) lesões escuras. Adaptado de Matarese *et al.*, 2003.

Embora os dados sobre a prevalência exata de endometriose sejam incertos, há relatos de que a endometriose pélvica afete 15 a 20% das mulheres em idade reprodutiva (Matarese *et al.*, 2003). Outros estudos apontam uma prevalência em torno de 5 a 10% (Kitawaki *et al.*, 2002; Giudice & Kao, 2004) nesta população. Das mulheres inférteis, 30 a 50% o são devido a esta patologia (Matarese *et al.*, 2003; Giudice & Kao, 2004).

Além de aliviar ou reduzir a dor, com o tratamento da endometriose pretende-se: diminuir o tamanho das lesões; reverter ou limitar a progressão da doença; preservar ou restaurar a fertilidade da paciente; e ainda evitar ou adiar a recorrência da doença. Os tratamentos, na maioria das vezes caros, envolvem a administração de androgênios, agonistas GnRH, progestinas e/ou contraceptivos orais. Entretanto, os medicamentos para diminuir as concentrações circulantes de estrogênios não podem ser usados continuamente pela paciente devido aos possíveis efeitos adversos (como osteoporose e risco à doença cardiovascular) ou a pretensão de gravidez. Neste último caso, o mais importante no tratamento da endometriose é o planejamento das ações terapêuticas em comum acordo com o planejamento da gravidez (Medicine, 2004). Novas drogas, algumas ainda em fase de avaliação, outras em uso clínico, encontram-se desenvolvidas para o tratamento da endometriose. Estes novos medicamentos incluem antagonistas da progesterona; moduladores seletivos dos receptores de estrogênios e/ou de progesterona (ER e/ou PR); agentes imunológicos; antiinflamatórios não esteroidais (AINES); inibidores de angiogênese; inibidores da metaloproteinase de matriz (MMP) e, até mesmo, agentes hipocolesterolêmicos (Chabbert-Buffet *et al.*, 2005; Ferrero *et al.*, 2005a; Harris *et al.*, 2005). Além destes, os inibidores da aromatase prometem ser a intervenção farmacológica de escolha, quando associados a agonistas GnRH, progestinas e/ou contraceptivos orais para as pacientes férteis (Bulun *et al.*, 1999; Zeitoun & Bulun, 1999; Bulun *et al.*, 2000b; Ferrero *et al.*, 2005a; Attar & Bulun, 2006). Muitas vezes como última alternativa para melhora da dor, as pacientes são submetidas a cirurgias freqüentes; embora cirurgias repetidas são desaconselhadas por aumentarem a chance de aderências peritoniais tão prejudiciais como a própria doença. Cerca de 75% das pacientes apresentam recidiva dos sintomas dois anos após a cirurgia (Giudice & Kao, 2004). A recorrência da detecção clínica da doença parece ser maior quanto mais avançado o estágio da endometriose ao primeiro diagnóstico (Parazzini *et al.*, 2005). Também estão associados à doença riscos



aumentados ao desenvolvimento de câncer – ovários, mama e pele, entre outros – enfermidades atópicas e desordens auto-imunes (Giudice & Kao, 2004). Salvo as condições fisiopatológicas das mulheres afetadas pela endometriose a saúde psicológica e emocional das mesmas também sustenta enorme relevância clínica. A questão torna-se ainda mais difícil nas pacientes que apresentam a “síndrome” da dor, manifestada por dismenorréia, dispareunia, defecação dolorosa e dor pélvica crônica (Fauconnier & Chapron, 2005; Ferrero *et al.*, 2005b).

Embora descrita pela primeira vez em 1860 por Rokitansky, a etiopatogenia da endometriose permanece obscura. Existem várias teorias para desvendar a patogênese da doença: menstruação retrógrada, metaplasia celômica e metástase de um fragmento ou células de uma lesão a alguma superfície propícia.

A teoria mais aceita para o desencadeamento da doença é a da menstruação retrógrada, postulada por Sampson em 1927 (Figura 5). Segundo esta, ocorre refluxo do conteúdo menstrual – incluindo-se células endometriais – pelas tubas uterinas até superfícies da cavidade peritoneal. O endométrio eutópico então invade este ambiente, aderindo-se às membranas superficiais de órgãos adjacentes, onde encontra condições sub-imunes e aporte sangüíneo favoráveis para o desencadeamento e sobrevivência das lesões típicas da endometriose. Estudos sugerem que a implantação ectópica do tecido endometrial requer uma resposta angiogênica adequada, ou seja, o endométrio humano é capaz de emitir sinais angiogênicos pelo ambiente que invade, causando a desestabilização da vascularização local e a atração desta rede de vasos para o seu entorno, onde a mesma é reestruturada (Groothuis *et al.*, 2005). A presença de vários fragmentos de endométrio eutópico e o aumento no volume do fluxo menstrual detectado em pacientes com endometriose auxiliam na fundamentação desta teoria. Cerca de 80 a 90% das mulheres em idade reprodutiva apresentam refluxo menstrual; destas, 6 a 10% desenvolvem endometriose (Giudice & Kao, 2004; Groothuis *et al.*, 2005).

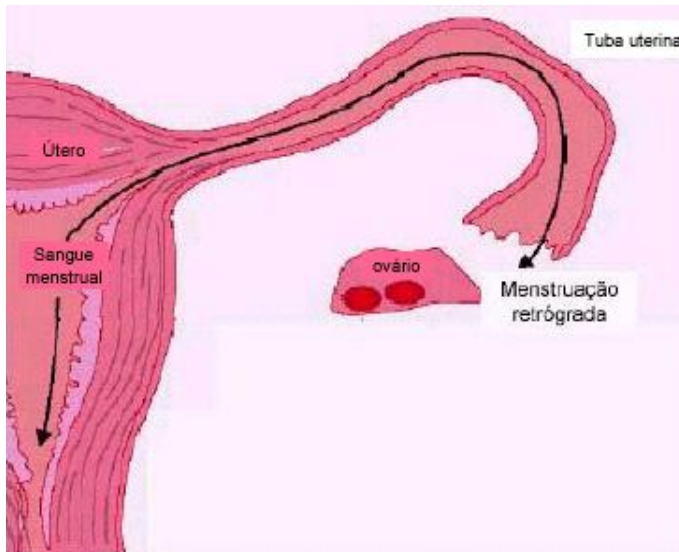


Figura 5 – Teoria da menstruação retrógrada. Modificado de Giudice & Kao, 2004.

Já o proposto pela metaplasia celômica explicaria a presença de endometriose em mulheres amenorrêicas e em homens. Nesta teoria, células peritoniais sob ação dependente de hormônios sexuais transformar-se-iam em epitélio tipo Mülleriano, originando as lesões características da doença.

#### **1.4 A endometriose como doença multifatorial**

A endometriose está associada a um conjunto de desordens de diferentes etiologias, sendo considerada uma doença multifatorial de caráter genético, hormonal e/ou imune.

##### **1.4.1 Aspectos Genéticos**

A endometriose parece estar relacionada à herança genética, sendo descritos genes candidatos ao desenvolvimento e progressão da doença. Além disso, há tempo suspeita-se de que a endometriose esteja relacionada a uma tendência familiar, visto que alguns estudos demonstram um aumento na frequência da doença entre parentes de primeiro grau especialmente quando considerada a linhagem materna (Simpson, 2002; Simpson, 2005). Kao e colaboradores descrevem genes que contribuiriam para a patogênese da endometriose e para os casos relacionados de infertilidade, incluindo o gene da aromatase, do receptor de progesterona e de

fatores de angiogênese; além de genes envolvidos nos processos de nidação, toxicidade embrionária, disfunções imunes, respostas apoptóticas relacionados a alterações da atividade mitótica do tecido e sobrevivência do endométrio ectópico (Kao *et al.*, 2003).

Há uma série de genes, e seus produtos, envolvidos na susceptibilidade e prognóstico da doença: ARO; galactose-1-fosfato-uridiltransferase (GALT); receptores de estradiol (ER), progesterona (PR) e androgênios (AR); gene supressor de tumor p53 (Simpson, 2002; Giudice & Kao, 2004); fator de sangramento endometrial (EBAF), de crescimento de hepatócitos (HGB), inibitório de leucemia e o de crescimento do endotélio vascular (VEGF); metaloproteinase de matriz (MMP) e inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP); receptor  $\gamma$  de proliferação dos peroxissomos (PPAR $\gamma$ ); 17 $\beta$ HSD; complemento C3; glutatona peroxidase; catalase; trombospondina 1; integrinas e glicodelinas (Simpson, 2002; Giudice & Kao, 2004).

#### 1.4.2 Aspectos Hormonais

A endometriose caracteriza-se por ser uma disfunção dependente de hormônios.

Além das células da granulosa dos folículos ovarianos, a enzima aromatase está presente em outros tecidos: fibroblastos do tecido adiposo e da pele, sinciciotrofoblasto placentário, ossos, endotélio vascular, musculatura lisa da aorta, cérebro e nos implantes endometrióticos (Simpson *et al.*, 1997; Gurates & Bulun, 2003). Está bem estabelecido o fato de o endométrio ectópico, ou seja, de os implantes endometrióticos serem dependentes de estrogênios para sua manutenção e crescimento.

Apesar da controvérsia sobre a presença da atividade da enzima aromatase no tecido endometrial de mulheres saudáveis, para vários autores, o endométrio de mulheres sem endometriose não expressa a ARO (Bulun *et al.*, 1993; Bulun *et al.*, 1994; Noble *et al.*, 1996; Kitawaki *et al.*, 1997; Dheenadayalu *et al.*, 2002; Gurates & Bulun, 2003). O endométrio responde à ação hormonal pela presença local de receptores hormonais específicos desigualmente expressos durante o ciclo menstrual. Estudos comprovam a presença de ER e, inclusive, ARO no endométrio ectópico, indicando que os implantes endometrióticos apresentam anormalidades relacionadas à produção e/ou ação dos esteróides. Muitos autores descrevem

aberrante expressão de ARO no endométrio ectópico e, por conseguinte, biossíntese local de  $E_2$  (Bulun *et al.*, 1993; Bulun *et al.*, 1994; Noble *et al.*, 1996; Zeitoun & Bulun, 1999; Bulun *et al.*, 2000a; Dheenadayalu *et al.*, 2002; Kitawaki *et al.*, 2002; Gurates & Bulun, 2003; Huang *et al.*, 2005; Morsch *et al.*, 2006) – incentivando a manutenção, crescimento e piora das lesões endometrióticas (Figura 6).

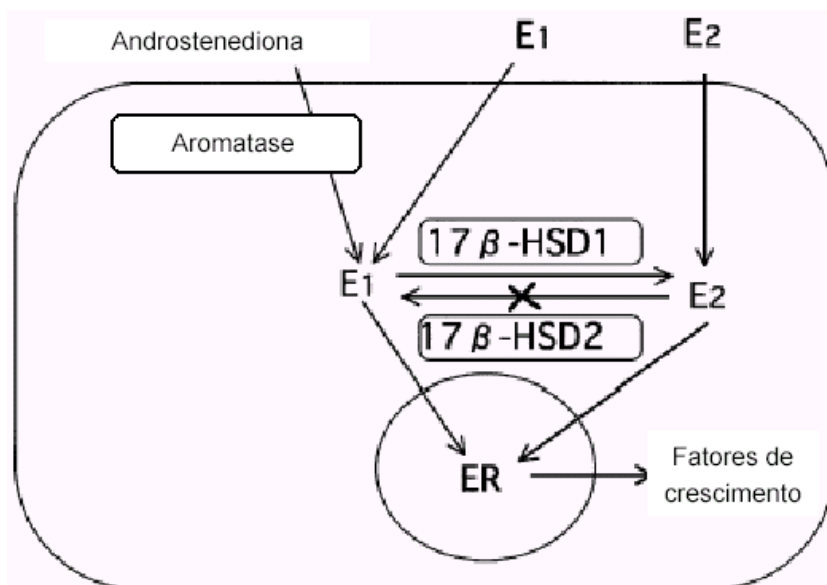


Figura 6 – Endometriose: atividade local da aromatase e insensibilidade à progesterona.  $E_1$  – Estrona;  $E_2$  – Estradiol; 17β-HSD1 – 17β-hidroxiesteróide-desidrogenase tipo 1; 17β-HSD2 – 17β-HSD tipo 2; ER – Receptores de estrogênio. Modificado de Kitawaki *et al.*, 2002.

Além disso, na endometriose, acredita-se que ocorra resistência tecidual à ação protetora e anti-estrogênica da progesterona (Zeitoun *et al.*, 1998; Zeitoun & Bulun, 1999; Attia *et al.*, 2000; Kitawaki *et al.*, 2002; Gurates & Bulun, 2003). Para a adequada diferenciação do endométrio durante a fase secretora do ciclo menstrual feminino, a P promove a indução da enzima 17βHSD-2 e processos de “down-regulation” dos ER. A 17βHSD-2 inativa o  $E_2$  por catalisar sua conversão à  $E_1$ , esteróide biologicamente menos ativo (Figura 3). Bulun *et al.*, 2000a, propõem que a possível resistência tecidual à P observada na endometriose poderia explicar o fato de muitas pacientes não responderem ao tratamento com progestinas, visto que esta insensibilidade geraria uma deficiência da 17βHSD-2 e, conseqüentemente, concentrações locais elevadas de  $E_2$  (Figura 7). Ainda não existe um consenso a respeito da atividade local da 17βHSD-2 na endometriose, visto que outros autores

descrevem aumento da enzima no tecido doente (Kitawaki *et al.*, 2000; Kitawaki *et al.*, 2002).

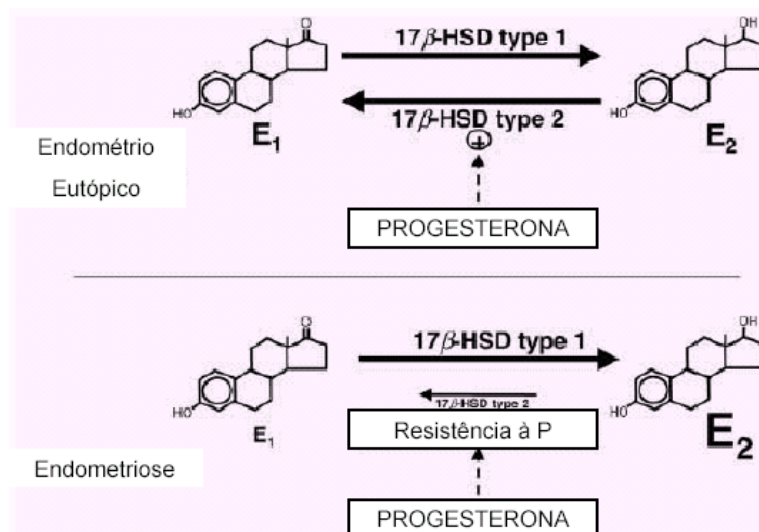


Figura 7 – Endometriose: inativação defeituosa de estradiol. P – Progesterona; E<sub>1</sub> – Estrona; E<sub>2</sub> – Estradiol; 17β-HSD type 1 – 17β-hidroxiesteróide-desidrogenase tipo 1; 17β-HSD type 2 – 17β-HSD tipo 2. Adaptado de Bulun *et al.*, 2000a.

A resposta tecidual, frente a diferentes hormônios sexuais, verificada no endométrio, deve-se à presença de receptores específicos. Portanto, o E<sub>2</sub> e a P atuam sobre o endométrio basicamente pela ligação a receptores próprios. A expressão local dos receptores de estrogênio (ER) e de progesterona (PR) é regulada pelos esteróides durante as diferentes fases do ciclo menstrual feminino. Por conseguinte, a proporção entre a expressão de ER e PR, bem como entre a expressão das suas diferentes isoformas, no endométrio, podem determinar a resposta tecidual frente a estrogênios e progestinas respectivamente (Sereepapong *et al.*, 2004).

Sabe-se que os hormônios sexuais não são secretados em quantidades constantes por todo o ciclo menstrual feminino e, conseqüentemente, ocorrem flutuações na expressão dos receptores hormonais correlacionados a estes eventos. No endométrio, as concentrações de ER são máximas durante toda a fase proliferativa do ciclo, declinando na segunda fase do mesmo (Fujishita *et al.*, 1997). Em células endometriais glandulares, os níveis de ER e PR, verificados por imunohistoquímica, decaem significativamente da fase proliferativa para a secretora do ciclo (Mylonas *et al.*, 2005).

### 1.4.2.1 Receptores Hormonais

Os ER e PR pertencem à superfamília dos receptores de hormônios esteróides, juntamente com os receptores de androgênios, glicocorticóides, mineralocorticóides, hormônios tireóideos e vitaminas A e D. A estrutura protéica destes receptores pode ser dividida em domínios individuais de funções específicas (Kumar *et al.*, 1987; Kuiper *et al.*, 1997; Oehler *et al.*, 2000), representados na Figura 8 e 9A:

- Região A/B: porção N-terminal do receptor que contém domínio(s) de transativação celular específico(s), designados por AF;
- Região C: constitui a zona central de reconhecimento dos elementos responsivos ao(s) hormônio(s) e de ligação ao DNA. Esta região apresenta dois sítios com zinco – a *zinc finger motif* – para mediar o acoplamento específico ao DNA. Assim sendo, a região C é o domínio de dimerização do receptor;
- Região D: parece ser o domínio de junção da região de ligação ao DNA (região C) com a de ligação ao hormônio esteróide (região E);
- Região E: porção C-terminal do receptor que constitui a região de acoplamento ao ligante, ou seja, de ligação ao hormônio esteróide. Esta região interage com os co-ativadores e co-repressores transcricionais. Também apresenta um domínio de transativação específico (AF). Além disso, está envolvida na dimerização do receptor e em sua localização nuclear;

Os receptores de estrogênio ainda apresentam um sexto domínio – a região F – responsável por modular sua própria taxa de transcrição.

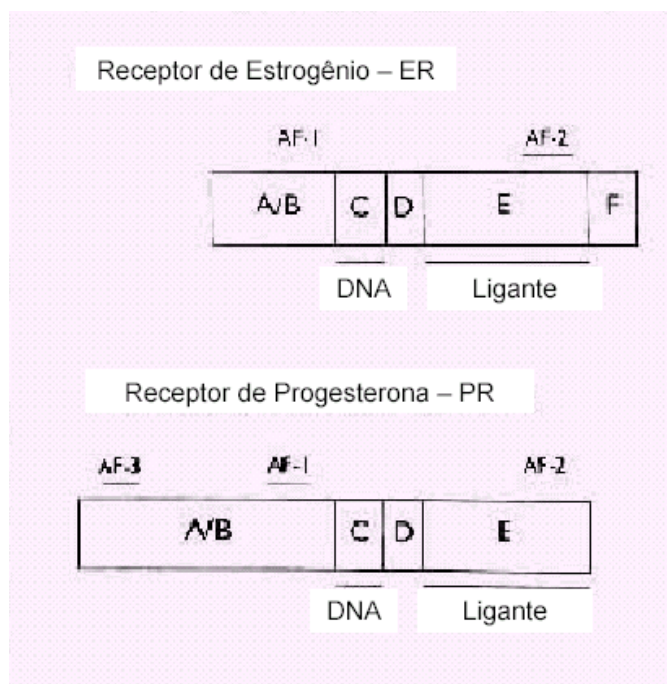


Figura 8 – Estruturas esquemáticas dos receptores hormonais ER e PR. Modificado de Oehler *et al.*, 2000.

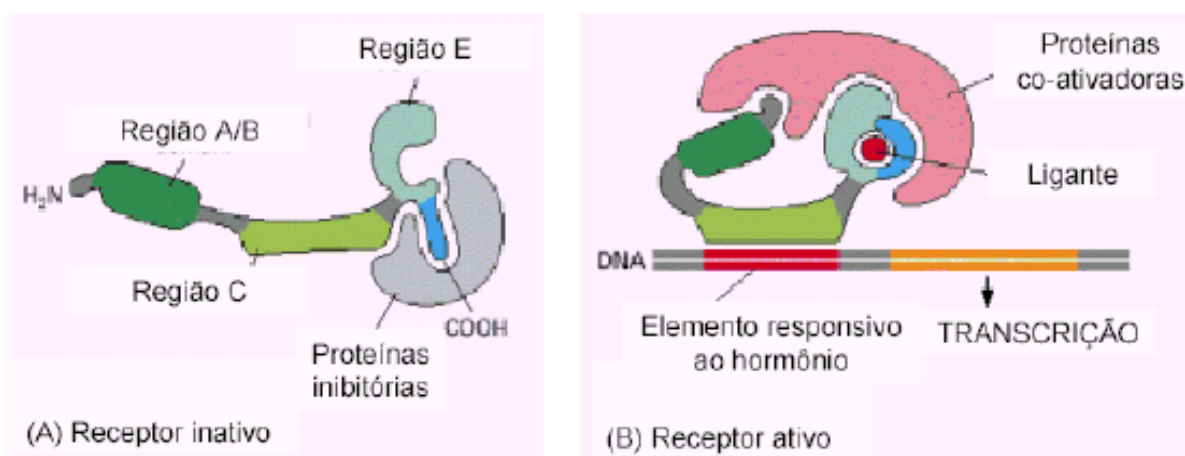


Figura 9 – Representação esquemática dos receptores hormonais ER e PR. (A) Receptor inativo; (B) Receptor ativo: acoplado ao ligante. Modificado de Alberts *et al.*, 2002 – Molecular Biology of the Cell, 4<sup>o</sup> edição.

A ligação do hormônio esteróide ao seu receptor específico provoca uma mudança conformacional na região E, levando à dissociação das chaperonas citoplasmáticas (proteínas inibitórias, como as de choque térmico) e à dimerização do mesmo. Este complexo receptor-ligante então interage com seqüências específicas do DNA conhecidas por elementos responsivos ao hormônio, no caso, ao estrogênio e à progesterona – ERE e PRE, respectivamente (Figura 9B). Estes ERE e PRE localizam-se nas regiões promotoras dos genes que o ligante regula

(Greene *et al.*, 1986), ou seja, próximos a genes responsivos a estrogênios e progestinas, respectivamente. Portanto os ER e PR atuam como fatores de transcrição, modulando a síntese de mRNA e de proteínas específicas.

Também são descritos mecanismos de transdução de sinal via receptores esteróides independentes de transcrição gênica e síntese protéica. Denominados como efeitos não genômicos dos receptores esteróides, estes modulam proteínas reguladoras da membrana ou do citoplasma celular. Várias ações biológicas dos esteróides têm sido associadas a este novo tipo de sinalização celular, como a regulação de proteínas quinases, por exemplo, a da Tirosina-quinase e a das MAP-quinases (Simoncini & Genazzani, 2003; Mulac-Jericevic & Conneely, 2004).

### **Receptores de Estrogênio (ER)**

São descritos dois subtipos de receptores de estrogênio. O receptor estrogênico “clássico”, hoje denominado  $ER\alpha$ , foi descoberto por Elwood Jensen em 1958. Clonado pela primeira vez a partir de células uterinas, o  $ER\alpha$  consiste em uma proteína de 595 aminoácidos com peso molecular de, aproximadamente, 65 kDa (Greene *et al.*, 1986). Kuiper e grupo (Kuiper *et al.*, 1996; Kuiper *et al.*, 1997) identificaram, inicialmente em tecido prostático de ratos e em ovário (células da granulosa) de ratas, o segundo receptor de estrogênio – o  $ER\beta$ . Segundo este mesmo grupo, o  $ER\beta$  contém 485 aminoácidos com peso molecular de, aproximadamente, 54,2 kDa. O  $ER\beta$  humano chega a ter 47% de homologia com o  $ER\alpha$  humano e ser cerca de 89% idêntico ao  $ER\beta$  de ratos e de camundongos (Enmark *et al.*, 1997). A estrutura protéica dos subtipos de ER humanos apresenta homologia de 97% no domínio de ligação ao DNA (região C) e de 59,1% no domínio de acoplamento ao ligante (região E) (Figura 10). O grau de homologia existente entre o  $ER\alpha$  e o  $ER\beta$  humanos é baixo, especialmente quando considerado o domínio de ligação ao ligante. Tal característica promove o uso de estrogênios sintéticos seletivos, designados para um ou outro subtipo de ER (Enmark & Gustafsson, 1999; Koehler *et al.*, 2005).



	DNA				Ligante	
<b>ER<math>\alpha</math></b>	A	B	C	D	E	F
<b>ER<math>\beta</math></b>		17.5%	97.0%	30.0%	59.1%	17.9%

Figura 10 – Homologia entre *ER $\alpha$*  e *ER $\beta$* . Adaptado de Oehler *et al.*, 2000.

A existência de dois subtipos de ER e a habilidade de formarem heterodímeros sugerem a existência de três mecanismos alternativos de sinalização para os hormônios estrogênicos: nas células que expressam somente um dos subtipos –  $\alpha$  ou  $\beta$  – formam-se homodímeros do receptor; enquanto nas que expressam ambos ER, heterodímeros podem surgir de acordo com a proporção existente de cada subtipo. Estas formas alternativas expandem o potencial fisioregulatório dos hormônios estrogênicos, permitindo uma interação diferenciada aos ERE (Kuiper & Gustafsson, 1997; Saunders, 1998). Paech e colaboradores, trabalhando com as propriedades transativadoras dos ER sobre diferentes elementos responsivos do gene promotor, sugeriram respostas gênicas distintas ao controle exercido pelos *ER $\alpha$*  e *ER $\beta$*  (Paech *et al.*, 1997). Este grupo verificou que a ligação de  $E_2$ -*ER $\beta$* -DNA (via AP1) inibe a transcrição gênica, enquanto que antagonistas estrogênicos ativariam o mesmo processo. Apesar do grande interesse sobre a distribuição celular e resposta dos *ER $\alpha$*  e *ER $\beta$*  frente à ação dos hormônios sexuais e seus antagonistas, a importância biológica da existência destes dois subtipos de ER, no endométrio, permanece obscura.

Utilizando RT-PCR semiquantitativo, Enmark *et al.*, 1997, detectaram a expressão de ambos ER em tecido da glândula mamária e útero, bem como em linhagens celulares de tumor de mama. O mesmo grupo, pela sensível técnica de RPA (*RNAse protection assay*), verificou a presença de *ER $\alpha$*  em endométrio, ovários e tumor de mama; e de *ER $\beta$*  em glândula mamária, pulmões e células isoladas da granulosa nos ovários.

## Receptores de Progesterona (PR)

São descritas duas isoformas do receptor de progesterona: *PR-A* e *PR-B*. O *PR-A* consiste em uma proteína de 769 aminoácidos com peso molecular de, aproximadamente, 94 kDa; enquanto o *PR-B* apresenta 933 aminoácidos com peso molecular de, aproximadamente, 114 kDa (Horwitz & Alexander, 1983; Horwitz *et al.*, 1986; Kastner *et al.*, 1990a). As isoformas do PR diferem apenas na porção N-terminal do receptor, visto que o *PR-B* apresenta 164 aminoácidos adicionais em relação ao *PR-A* (Figura 11). Esta diferença estrutural entre as isoformas do PR confere funções de transativação específicas para o *PR-B*, capaz, então, de ativar genes não responsivos ao *PR-A*.

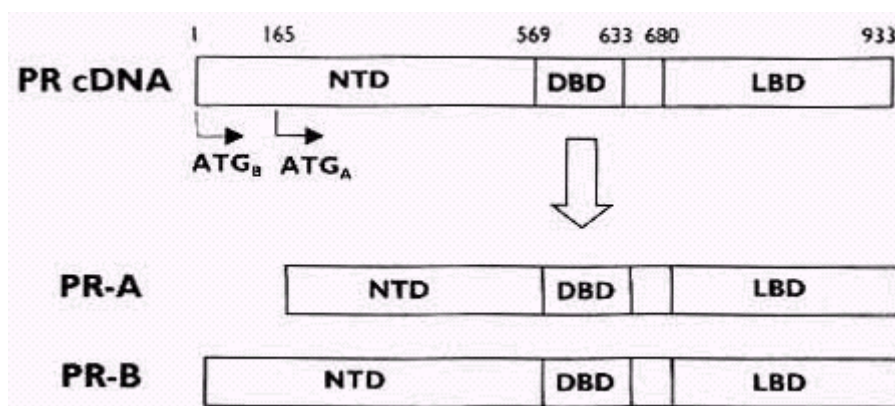


Figura 11 – Estruturas esquemáticas dos receptores hormonais *PR-A* e *PR-B*. NTD – domínio N-terminal; DBD – domínio de ligação ao DNA; LBD – domínio de ligação ao ligante. Adaptado de Oehler *et al.*, 2000.

Os estrogênios e a progesterona aumentam e diminuem, respectivamente, a expressão dos receptores de progesterona nos tecidos-alvo. O *PR-A* e o *PR-B* são ou resultado do processo de transcrição a partir de promotores alternativos no mesmo gene, gerando, portanto, dois mRNAs distintos (Kastner *et al.*, 1990a; Kastner *et al.*, 1990b; Gronemeyer *et al.*, 1991); ou resultado da tradução em sítios diferentes do mesmo mRNA (Conneely *et al.*, 1987). Deve-se lembrar que a transcrição de um único gene a partir de promotores diferentes adiciona flexibilidade ao controle da expressão gênica, bem como prováveis diferenças funcionais nas proteínas finalmente traduzidas.

Há evidências de que as isoformas do PR sejam funcionalmente diferentes e de que regulem a transcrição gênica de maneira específica ao tipo celular e ao

promotor nuclear correlacionado. Semelhante ao que ocorre com os receptores de estrogênios, o *PR-A* e *PR-B* também podem formar homo e/ou heterodímeros intracelulares de acordo com a proporção existente de cada isoforma. As formas alternativas do PR, como homo e/ou heterodímeros, expandem o repertório fisiológico de resposta à progesterona (Conneely & Lydon, 2000; Conneely *et al.*, 2003).

Sabe-se que o *PR-B* promove a transcrição de genes responsivos à P. Portanto, o *PR-B* está relacionado à resposta anti-estrogênica propriamente dita: processos de apoptose e diferenciação celular; inativação de estrogênios e “down-regulation” de ERs (Figura 12A – Esq.). Por sua vez, a isoforma *A* demonstra ser a repressora dominante do *PR-B* (Figura 12A – Dir.) (Vegeto *et al.*, 1993; Wen *et al.*, 1994; Graham & Clarke, 1997; Mangal *et al.*, 1997). O *PR-A* ainda parece estar envolvido com a repressão da atividade transcricional de outros receptores esteróides, incluindo-se estrogênios, glicocorticóides, androgênios e mineralocorticóides (Figura 12B) (Vegeto *et al.*, 1993; McDonnell & Goldman, 1994; McDonnell *et al.*, 1994; Wen *et al.*, 1994; Giangrande *et al.*, 2000). Sob essas considerações, Mulac-Jericevic e colaboradores observaram que agonistas do *PR-A* podem inibir tanto a atividade transcricional do *PR-B* como do *ER- $\alpha$*  (Mulac-Jericevic *et al.*, 2000).

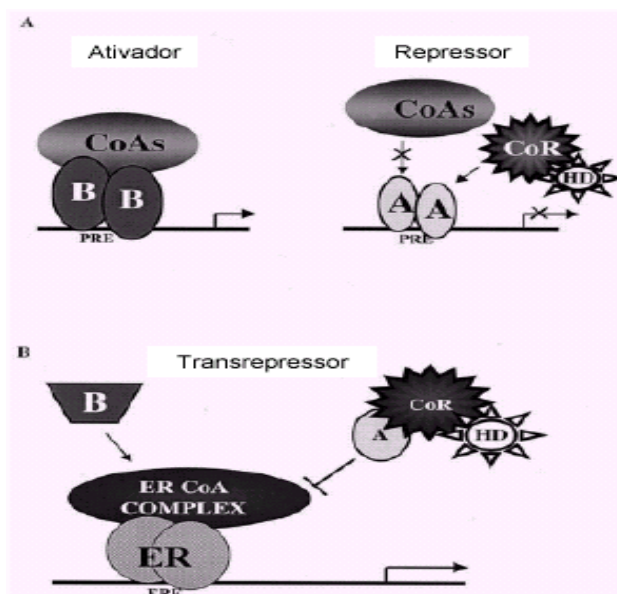


Figura 12 (A-Esq.) – Mecanismo molecular de ação do *PR-B*, promovendo a transcrição gênica. Coas = proteínas co-ativadoras; B = *PR-B*; PRE = elementos responsivos à progesterona. (A-Dir.) – Mecanismo molecular de ação do *PR-A*, inibindo a transcrição gênica. A = *PR-A*; Cor = proteínas co-repressoras; HD = histonas. (B) Mecanismo molecular de ação do *PR-A* sobre *Er $\alpha$* , reprimindo sua atividade transcritora. ER = *ER $\alpha$* ; ERCoA COMPLEX = complexo co-ativador do *ER $\alpha$* ; ERE = elementos responsivos a estrogênios. Adaptado de Giangrande *et al.*, 2000.

O *PR-A* encontra-se constantemente expresso no endométrio durante o ciclo menstrual feminino, enquanto que a isoforma *B* oscila (Feil *et al.*, 1988). Mangal *et al.*, 1997, também descreveram mudanças na expressão relativa de *PR-A/PR-B* de acordo com as fases do ciclo menstrual.

As concentrações do PR refletem as mudanças ocorridas nas células glandulares do endométrio, visto que as alterações de *PR-A* e *PR-B* não chegam a ser significativas nas células estromais. As concentrações do PR no epitélio glandular crescem durante a fase proliferativa do ciclo, sob influência do  $E_2$ , e regridem após a ovulação pela crescente presença de P (Garcia *et al.*, 1988; Snijders *et al.*, 1992; Fujishita *et al.*, 1997; Mangal *et al.*, 1997). Snijders *et al.*, 1992, inclusive assumem que as concentrações de PR são máximas nas células endometriais glandulares nos primeiros dias da fase secretora quando, então, sofrem uma drástica redução. Apesar da ausência de PR nas células glandulares em fase secretora, as células estromais continuam a expressá-los (Garcia *et al.*, 1988; Snijders *et al.*, 1992). Ainda referente às flutuações hormonais, o *PR-B* parece ser a isoforma mais sensível a esta exposição (Mangal *et al.*, 1997).

Mangal *et al.*, 1997, utilizando extratos de endométrio e a técnica de *Western blott*, observaram que os níveis de *PR-A* são sempre superiores aos de *PR-B*, não importando a fase do ciclo menstrual considerada. Concluíram ainda que em meios hipoestrogênicos, a expressão de *PR-B* encontra-se reduzida.

### 1.4.3 Aspectos Imunológicos

O sistema imune parece estar envolvido na patogênese da endometriose visto que a enfermidade apresenta características de doença inflamatória crônica. Inúmeros componentes do sistema imune encontram-se alterados nas mulheres com endometriose, ocorrendo secreção aumentada de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, prostaglandinas e proteinases (Jones *et al.*, 1998; Gurates & Bulun, 2003; Giudice & Kao, 2004). A carência de respostas imunológicas adequadas, criando condições sub-imunes, pode ser agregada aos demais aspectos associados à instalação e sobrevivência das lesões endometrióticas.

Bulun e colaboradores propuseram um modelo molecular de interação entre as propriedades celulares proliferativas e inflamatórias na endometriose (Bulun *et al.*, 2001). Segundo este modelo, o  $E_2$  promove a produção local de prostaglandina- $E_2$  ( $PGE_2$ ) via indução, direta ou indireta, da PGE-sintase-2 (COX-2). Por sua vez, a  $PGE_2$  é conhecida como potente indutora da atividade da ARO na endometriose. Portanto, este mecanismo de *feedback* positivo resulta em intensa produção de  $E_2$  e  $PGE_2$  no tecido endometriótico.

Está bem estabelecida a associação de metaloproteinases de matriz (MMP) às condições normais de desenvolvimento e crescimento do endométrio, como sua participação no processo fisiológico da menstruação. Entretanto, a expressão aberrante de MMP é relacionada à invasão e ao remodelamento tecidual provocados pelo implante endometriótico (Zhou & Nothnick, 2005).

A presença de tecido endometriótico fora da cavidade uterina – o que caracteriza a endometriose – sugere anomalias intrínsecas ao endométrio ectópico associadas a neoangiogênese, deficiência na resposta mediada por células e presença de auto-anticorpos (Matarese *et al.*, 2003; Ulukus & Arici, 2005) (Figura 13).

Alterações da imunidade celular relacionadas à diminuição da citotoxicidade de células T e T *natural killers* (NK), bem como ao aumento do número e da ativação de

macrófagos, resultam na inadequada remoção de células do endométrio ectópico da cavidade peritoneal. Além disso, o aumento da produção local de inúmeras citocinas e fatores de crescimento pelo sistema imune e pelo próprio endométrio ectópico, promovem a implantação dos fragmentos endometriais e induzem processos de proliferação e angiogênese (Figura 13). Suspeita-se que a endometriose seja uma doença auto-imune pela presença de auto-anticorpos locais e circulantes, além de outras manifestações auto-imunes associadas.

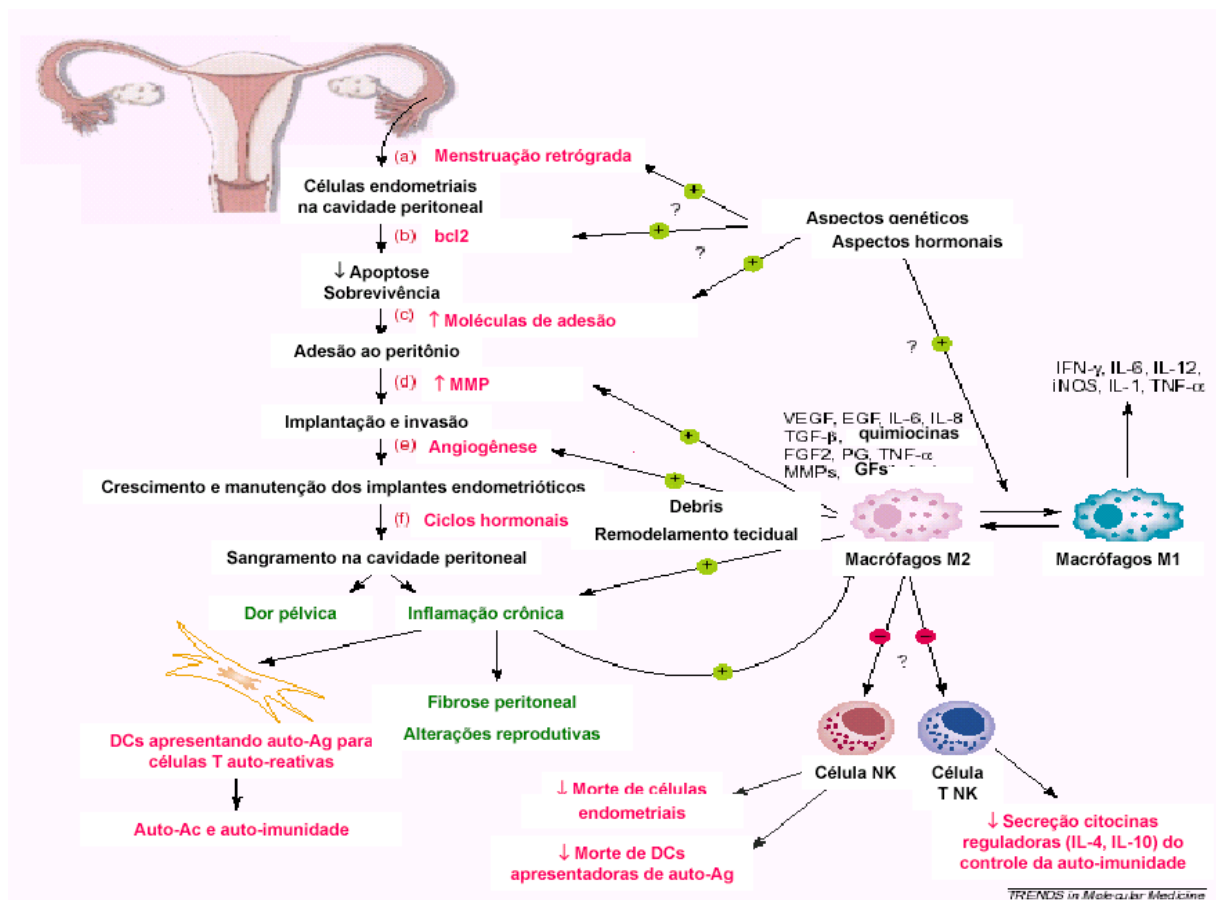


Figura 13 – Resposta imunológica na endometriose. Auto-Ag – auto-antígenos; Auto-Ac – auto-anticorpos; DCs – células dendríticas; EGF – fator de crescimento da epiderme; FGF – fator de crescimento de fibroblastos; IFN – interferon; IL – interleucina; iNOS – sintase de ácido nítrico; MMP – metaloproteinase de matriz; PG – prostaglandina; TGF – fator de transformação; TNF – fator de necrose tumoral; VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular. Adaptado de Matarese *et al.*, 2003.

Acredita-se que deva existir algum desequilíbrio entre os processos de proliferação e apoptose celular na endometriose. O aumento na expressão de moléculas anti-apoptóticas verificadas no endométrio ectópico podem contribuir para

o desenvolvimento da endometriose, conferindo-lhe resistência frente às respostas imunológicas e elevando suas chances de sobrevivência fora do útero (Nishida *et al.*, 2005). Goumenou *et al.*, 2004, apontaram que a apoptose é um processo de regulação do endométrio ectópico, que colabora para sobrevivência do mesmo. De acordo com outros autores, foi observada uma diferença significativa no índice de apoptose entre endometriose e endométrio controle, sendo muito menor na presença da doença (Meresman *et al.*, 2002). Tanto a apoptose, como as proteínas correlacionadas com mesma, desempenham importante papel nas mudanças ocorridas no endométrio durante as fases do ciclo menstrual. Isto porque a apoptose é descrita como um processo fisiológico de morte celular programada, onde a célula utiliza um especializado maquinário para matar a si mesma.

#### **1.4.3.1 B cell lymphoma/leukemia 2 (*bcl2*)**

Uma das proteínas mais estudadas na regulação do processo de apoptose celular é a *bcl2* – B cell lymphoma/leukemia 2. A *bcl2* constitui uma proteína de membrana mitocondrial, com peso molecular de, aproximadamente, 25 kDa. Consta que foi inicialmente descrita de uma translocação cromossômica – t(14; 18) – em linfoma de células B foliculares humanas; sendo atualmente caracterizada em vários tipos celulares além do tecido linfóide: epitélio glandular, pele, intestinos e neurônios (Hockenbery *et al.*, 1991). O gene da *bcl2* pertence a um novo grupo de protooncogenes que prolongam a sobrevivência celular, neutralizando e bloqueando seus mecanismos de apoptose (Hockenbery *et al.*, 1990; Gompel *et al.*, 1994; Hockenbery, 1995). Em resposta a fatores promotores do crescimento, como hormônios esteróides e fatores de crescimento, a expressão nuclear de outros protooncogenes (*c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, *c-myb*) também se altera rapidamente (Schuchard *et al.*, 1993). Morsch *et al.*, 2006 (*in press*) demonstram níveis de mRNA para *c-fos* significativamente elevados em endométrio ectópico; enquanto não existem diferenças na expressão gênica do mesmo em endométrio eutópico de endometriose e de pacientes inférteis.

A habilidade da *bcl2* em antagonizar a morte celular é modulada pela sua interação a proteínas apoptóticas, inclusive à família das *Bax* (proteínas ativadoras da apoptose). O controle da apoptose acontece pela interação das proteínas

ativadoras e repressoras que atuam por vias de sinalização entre a superfície e o meio intracelular, respectivamente, ativando ou inibindo proteases internas, como as caspases (Li & Yuan, 1999).

São descritos “down-regulation” de genes pró-apoptóticos e “up-regulation” dos anti-apoptóticos em endométrio eutópico e ectópico de endometriose.

Apesar do constante interesse sobre os protooncogenes, o mecanismo de ação da *bcl2* permanece em debate (Pinton *et al.*, 2001).

Os resultados de Gompel *et al.*, 1994, apontavam que a expressão da *bcl2*, por imuno-histoquímica, em endométrio seria diretamente dependente de hormônios sexuais. Goumenou *et al.*, 2004 verificaram que a diminuição da relação *bcl2/Bax*, no endométrio eutópico, precede a fragmentação do DNA, favorecendo a ocorrência de apoptose na fase secretora do ciclo menstrual. Pela mesma técnica, imuno-histoquímica, a apoptose e a presença das proteínas reguladoras *bcl2* e *Bax* não apresentaram variações cíclicas à fase menstrual em endométrio ectópico, sugerindo que os mecanismos de controle da apoptose neste tecido possam ser regulados de forma independente à verificada no endométrio eutópico (Goumenou *et al.*, 2004).

Considerando a apresentação multifatorial da endometriose, torna-se relevante estudar a expressão de diferentes genes a fim de elucidar os envolvidos com o controle da proliferação, da diferenciação e do ciclo celular em endométrio de pacientes com endometriose e de mulheres inférteis sem a doença.



## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo Geral

Caracterizar a expressão de genes relacionados aos processos de proliferação e diferenciação celular em implantes endometrióticos e endométrio eutópico de mulheres inférteis sem e com endometriose.

### 1.5.2 Objetivos específicos

(1) Caracterizar a expressão gênica do *ER $\alpha$*  em endométrio eutópico e ectópico de pacientes com endometriose e mulheres inférteis sem endometriose.

(2) Caracterizar a expressão gênica do *PR-A* e *PR-B* em endométrio eutópico e ectópico de pacientes com endometriose e mulheres inférteis sem endometriose.

(3) Caracterizar a expressão gênica da *bcl2* em endométrio eutópico e ectópico de pacientes com endometriose e mulheres inférteis sem endometriose.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Delineamento do estudo**

Caso-controle, prospectivo.

### **2.2 Obtenção das amostras de tecido endometrial**

Foram selecionadas 34 pacientes, consultando por infertilidade na Unidade de Reprodução Humana do Hospital de Clínicas de Minas Gerais e do Instituto Biocor do Brasil. Quinze apresentavam endometriose e 19 tinham infertilidade na ausência de endometriose. As pacientes não estavam usando nenhuma medicação hormonal que pudesse interferir com a avaliação molecular e a infertilidade foi caracterizada como ausência de gravidez após um ano de relações sexuais sem proteção. As amostras de tecido endometrial foram obtidas a partir de biópsias de endométrio, realizadas na fase folicular, pela equipe de Belo Horizonte. As amostras foram transportadas em nitrogênio líquido e armazenadas à temperatura de -80°C para processamento posterior.

A partir dos achados histológicos e de laparoscopia do endométrio, foram constituídos 3 grupos: controle, endométrio das pacientes inférteis sem endometriose; eutópico, endométrio tópico das pacientes com endometriose e ectópico, fragmento do implante endometriótico. A organização dos grupos está detalhada na Figura 14.

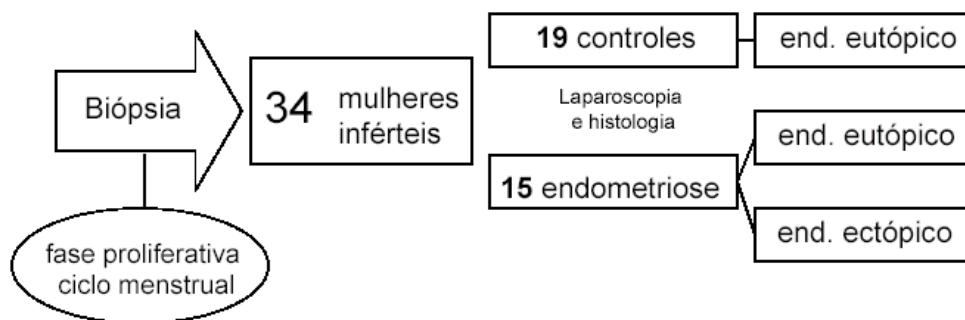


Figura 14 – Representação esquemática da amostra.

A avaliação clínica das pacientes incluiu medidas antropométricas como peso, altura, índice de massa corporal (IMC), relação cintura/quadril (RCQ) e dosagem da proteína carreadora de hormônios esteróides (SHBG).

## 2.3 Avaliação da expressão gênica por RT-PCR

### 2.3.1 Extração e quantificação do RNA total

Esta etapa do trabalho foi realizada pela equipe de Belo Horizonte, e as seguintes pela autora. O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen™ Life Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante. Os fragmentos de tecido endometrial foram pulverizados e lisados com a adição de Trizol®, mantidos no gelo. O RNA total foi extraído com clorofórmio e precipitado com isopropanol por centrifugação (12000xg a 4°C). O RNA total foi lavado com etanol 75% e ressuspenso em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O RNA foi quantificado por absorvância de luz a 260 nm em espectrofotômetro GeneQuant.

### 2.3.2 Síntese do cDNA

A síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) foi originada a partir de 5 µg de RNA total, utilizando-se o sistema de pré-amplificação *Super-Script First-strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen™ Life Technologies), conforme

instruções do fabricante. O RNA molde foi desnaturado inicialmente a 65°C por 5 min. juntamente com uma mistura dos dNTPs (10 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP). O anelamento dos oligo(dT)<sub>12-18</sub> (0,5 µg/µL) foi realizado a 42°C por 2 min. juntamente com a adição de uma mistura de tampão RT 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl), MgCl<sub>2</sub> (25 mM), DTT (0,1 M) e inibidor de RNase recombinante (*RNaseOUT*<sup>TM</sup>, 40 U/µL). Adicionou-se, então, 1µL de *Superscript*<sup>TM</sup> II RT (50 U/µL) a cada tubo de reação e a síntese do cDNA foi realizada durante 50 min. a 42°C. A reação foi finalizada por incubação a 70°C por mais 15 min. O volume da reação foi coletado por breve centrifugação e incubado por 20 min. a 37°C com *RNase H* de *E. coli* (2 U/µL) antes de se proceder a amplificação dos fragmentos de DNA de interesse.

### 2.3.3 Protocolo geral da PCR

A amplificação dos genes de interesse foi realizada utilizando-se a RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*). A RT-PCR foi efetuada para um volume final de 50 µL de reação. As amostras de cDNA foram desnaturadas a 94°C por 2 min. em presença de tampão PCR 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl) e MgCl<sub>2</sub> (50 mM). Após o pré-aquecimento, 1,25 U de *Taq DNA Polimerase* foram adicionadas juntamente com tampão PCR 10X, MgCl<sub>2</sub>, *primers sense* e *antisense* e 0,2 mM da mistura equivalente de dNTPs (Tabela 1). Na tabela 2 encontram-se listados o tamanho e a seqüência dos fragmentos dos genes amplificados. A tabela 3 apresenta as condições da PCR para os diferentes genes estudados.

O gene ubíquo  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2m$ ) foi amplificado para ajustar a quantidade de cDNA em cada amostra. O produto de reação da primeira fita de DNA (cDNA) realizado sem transcriptase reversa foi amplificado para servir como controle negativo a cada gene estudado. Utilizou-se como controle positivo das reações, o cDNA sintetizado a partir do RNA total de tecido prostático ou placentário intactos.

Os genes amplificados foram separados em gel de agarose 1,5 % para os fragmentos com mais de 200 pares de base (pb) e em gel de agarose *low melting* a 2% para os fragmentos menores de 200 pb; corados com brometo de etídio,

submetidos à eletroforese a 120 V e visualizados sob luz ultravioleta. As bandas esperadas foram quantificadas por análise densitométrica pelo sistema processador de imagens ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

Tabela 1 – **Protocolo geral da PCR**

Reagentes	Mistura inicial ( $\mu\text{L}$ )	Mistura <i>Pos-Hot-Start</i> ( $\mu\text{L}$ )
Água com DEPC	34,3	6,5
Tampão PCR 10X	4,0	1,0
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,2	0,3
dNTPs (10 mM)		1,0
<i>Primer sense</i>		*
<i>Primer antisense</i>		*
cDNA	*	
<i>Taq DNA Polimerase</i>		0,2

Os volumes se referem a cada reação de 50  $\mu\text{L}$ . Com exceção do cDNA, todos os reagentes eram reunidos numa mistura inicial que era agitada suavemente e pipetada nos tubos. Cada tubo recebeu 10  $\mu\text{L}$  da mistura PHS que continha a *Taq DNA Polimerase*.

\* Volume correspondente à padronização do gene de interesse.

**Tabela 2 – Lista dos genes utilizados para realização da RT-PCR, seqüência dos primers e tamanho dos fragmentos amplificados (pb)**

Gene	Primer	Fragmento	Referência
<i>bcl2</i>		304	(Chen <i>et al.</i> , 2000)
<i>sense</i>	5' GTGGAGGAGCTCTTCAGGGA 3'		
<i>antisense</i>	5' AGGCACCCAGGGTGATGCAA 3'		
<i>ER<math>\alpha</math></i>		483	(Dotzlaw <i>et al.</i> , 1997)
<i>sense</i>	5' CAGGGGTGAAGTGGGGTCTGCTG 3'		
<i>antisense</i>	5' ATGCGGAACCGAGATGATGTAGC 3'		
<i>PR-A</i>		68	(Sakaguchi <i>et al.</i> , 2004)
<i>sense</i>	5' AGAGCACTGGATGCTGTTGCT 3'		
<i>antisense</i>	5' TGGCTTAGGGCTTGGCTTT 3'		
<i>PR-B</i>		77	(Sakaguchi <i>et al.</i> , 2004)
<i>sense</i>	5' GCCAGACCTCGGACACCTT 3'		
<i>antisense</i>	5' CAGGGCCGAGGGAAGAGTAG 3'		
<i><math>\beta_2m</math></i>		623	(Taplin <i>et al.</i> , 1995)
<i>sense</i>	5' ATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAG 3'		
<i>antisense</i>	5' AAATTGAAAGTTAACTTATGCACGC 3'		
<i><math>\beta_2m</math></i>		165	(Programa Primer 3
<i>sense</i>	5' CTATCCAGCGTACTCCAAAG 5'		<a href="http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.results.cgi">http://frodo.wi.mit.edu/cgi-</a>
<i>antisense</i>	5' ACAAGTCTGAATGCTCCACT 5'		<a href="http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.results.cgi">bin/primer3/primer3_www.results.cgi</a> )

Tabela 3 – Condições da PCR dos diferentes genes estudados

Gene	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Ciclos	Extensão. final
<i>bcl2</i>	94°C 1 min.	59°C 45 s	72°C 45 s	35	72°C 5 min.
<i>ER<math>\alpha</math></i>	94°C 1 min.	65°C 30 s	72°C 1 min.	35	72°C 5 min.
<i>PR-A</i>	94°C 30 s	60°C 30 s	72°C 45 s	35	72°C 5 min.
<i>PR-B</i>	94°C 30 s	59°C 30 s	72°C 45 s	32	72°C 5 min.
<i><math>\beta_2m^*</math></i>	94°C 1 min.	55°C 1 min.	72°C 1 min.	30	72°C 5 min.
<i><math>\beta_2m^{**}</math></i>	94°C 30 s	55° C 30 s	72°C 30 s	30	72°C 5 min.

Obs.: Protocolos ajustados segundo referências da Tabela 2.

\* Fragmento de 623 pb. \*\* Fragmento de 165 pb.

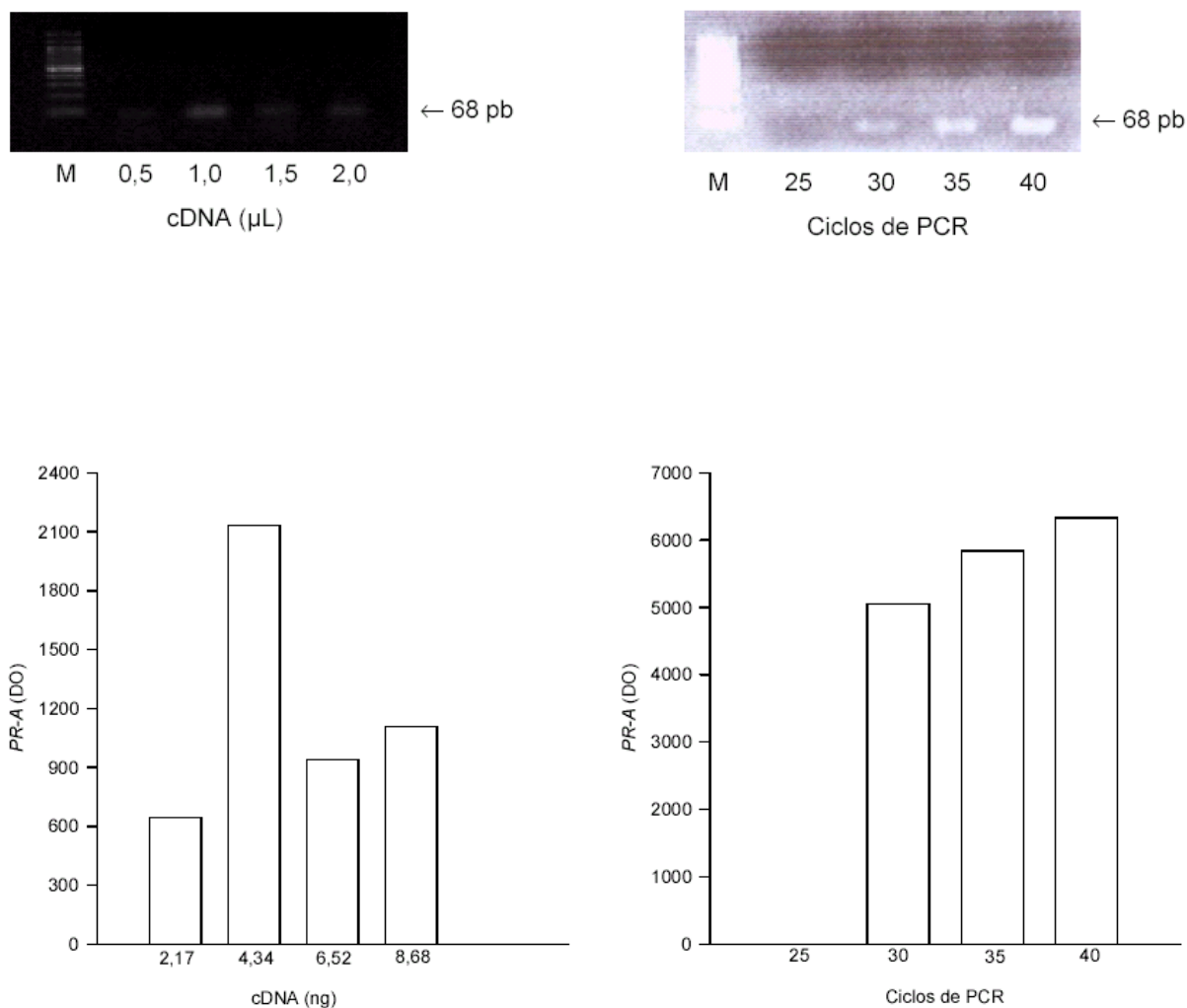
## 2.4 Padronização das PCR

As reações de PCR foram conduzidas em termociclador PT100 (MJResearch, Inc.). Todas as reações foram precedidas de pré-aquecimento a 94°C durante 2 min. (*Hot-Start*). Neste estudo, foram padronizados a quantidade de cDNA e o número de ciclos para amplificação dos fragmentos específicos dos genes *PR-A*, *PR-B* e  *$\beta_2m$*  (165 pb). Para este último, também se padronizou a quantidade de primers *sense* e *antisense* da mistura *Pos-Hot-Start*, bem como o tempo de duração da etapa de extensão da PCR (Tabelas 1 – 3). Para amplificação dos fragmentos dos genes  *$\beta_2m$*  (623 pb), *bcl2* e *ER $\alpha$*  foram utilizados oligonucleotídeos específicos e as condições para cada PCR seguiram as padronizações previamente utilizadas por nosso grupo em tecido prostático humano (Brum *et al.*, 2003; Cericatto *et al.*, 2005) e em fibroadenoma (Brum *et al.*, 2003; Cericatto *et al.*, 2005) (Tabelas 1 – 3).

### 2.4.1 Padronização da PCR para *PR-A*

Os *primers* utilizados para o estudo do mRNA do receptor de progesterona isoforma A (*PR-A*) foram sintetizados a partir da seqüência do gene celular humano normal (Sakaguchi *et al.*, 2004). A figura 15 mostra as curvas de padronização da PCR para o gene do *PR-A*. As reações das PCR foram realizadas utilizando-se cDNAs sintetizados a partir de 5 µg de RNA total. Com 2,17 ng de cDNA já foi possível detectar a expressão do *PR-A* e atingiu-se um máximo com 4,34 ng de cDNA. Uma curva composta de 25, 30, 35 e 40 ciclos foi estabelecida para o gene do *PR-A*. O número mínimo de ciclos necessários para amplificar este fragmento foi de 30 ciclos e um máximo de 40 ciclos. Com base nestes resultados, optou-se por amplificar as amostras com 4,34 ng de cDNA por 35 ciclos (Figura 15).





**Figura 15 – Padronização da PCR para determinação dos níveis de mRNA do *PR-A* em tecido endometrial**

As curvas de quantidades de cDNA (ng) e número de ciclos, a partir de 5 µg de RNA total, foram realizadas com 30 ciclos e 4,34 ng de cDNA, respectivamente. As barras representam unidades arbitrárias de densidade óptica das bandas de 68 pb. M = marcador de peso molecular.

#### 2.4.2 Padronização da PCR para *PR-B*

Os *primers* utilizados para o estudo do mRNA do receptor de progesterona isoforma *B* (*PR-B*) foram sintetizados a partir da seqüência do gene celular humano normal (Sakaguchi *et al.*, 2004). A figura 16 apresenta os dados referentes à padronização da PCR para amplificação do *PR-B*. Usando-se cDNAs sintetizados a partir de 5 µg de RNA total, obteve-se uma expressão mínima com 2,17 ng de cDNA e aumentada com 8,68 ng de cDNA. Observou-se aumento progressivo da expressão gênica com 30, 32 e 35 ciclos, diminuindo a partir de 38 ciclos. Desta forma, foi escolhida a condição de 6,52 ng de cDNA e 32 ciclos para as reações de amplificação do *PR-B* (Figura 16).

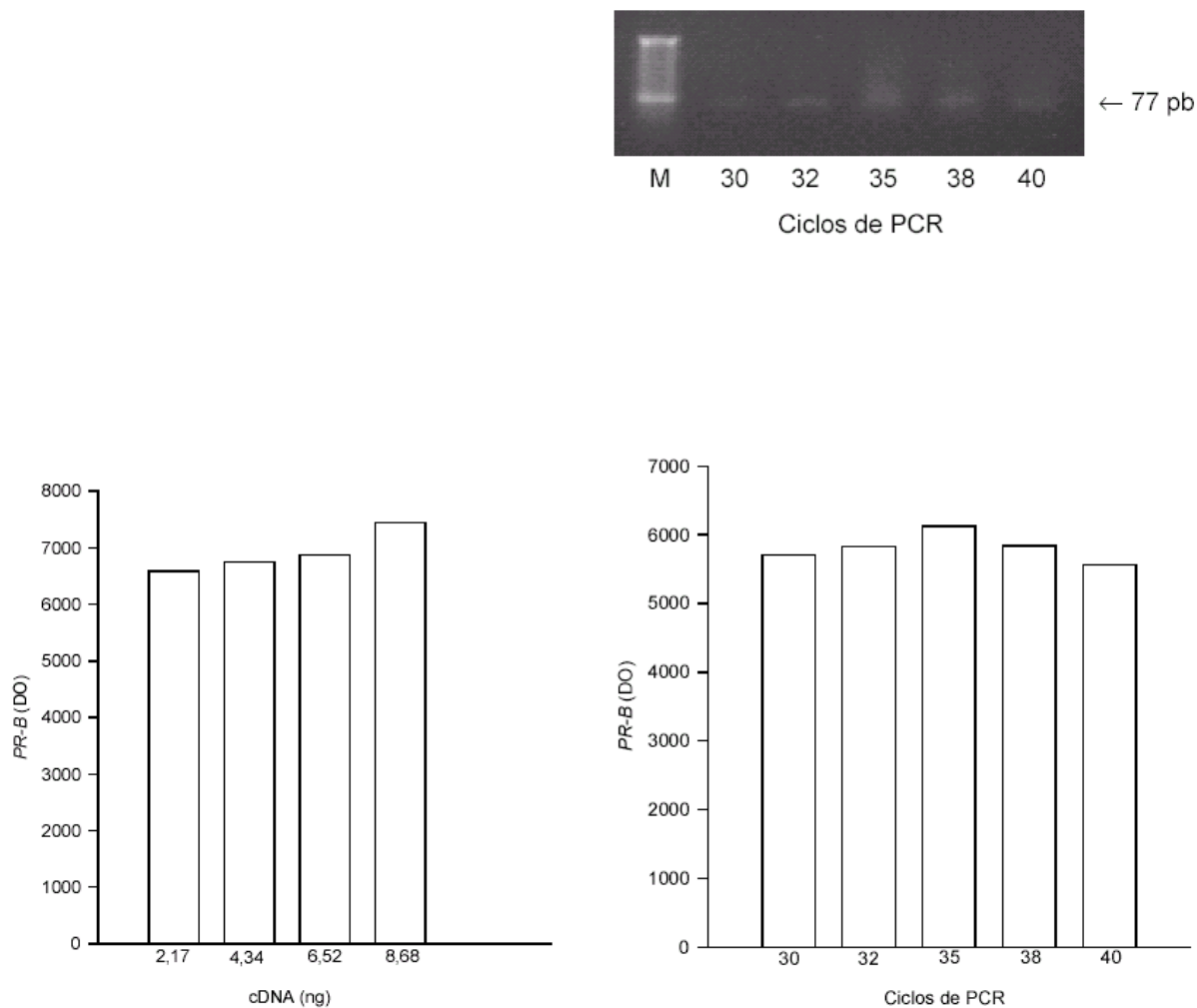


Figura 16 – **Padronização da PCR para determinação dos níveis de mRNA do *PR-B* em tecido endometrial**

As curvas de quantidades de cDNA (ng) e número de ciclos, a partir de 5  $\mu$ g de RNA total, foram realizadas com 32 ciclos e 4,34 ng de cDNA, respectivamente. As barras representam unidades arbitrárias de densidade óptica das bandas de 77 pb. M = marcador de peso molecular.

### 2.4.3 Padronização da PCR para $\beta_2m$ (165 pb)

Os *primers* utilizados para o estudo do mRNA da ubíquo  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2m$ ) de 165 pb foram desenhados para este estudo, a partir da seqüência do gene celular humano normal (Programa Primer 3, [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.results.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.results.cgi)). Como mostram as figuras 17 e 18, com cDNAs sintetizados a partir de 4  $\mu$ g de RNA total, foi inicialmente realizada a verificação do tempo de extensão a 72°C para o protocolo desta PCR. O volume de *primers sense* e *antisense* foi estabelecido, mostrando que a quantidade mínima de primers necessária para amplificar este fragmento foi de 0,5  $\mu$ L. Uma curva composta de 20, 25, 30, 35 e 40 ciclos foi estabelecida para o gene da  $\beta_2m$  (165 pb). O número mínimo de ciclos necessários para amplificar este fragmento foi de 30 ciclos, com aumento progressivo até 40 ciclos. Com base nestes achados, optou-se por amplificar as amostras durante 30 s na etapa de extensão a 72°C, com 0,5  $\mu$ L de *primer sense* e *antisense* por 30 ciclos (Figuras 17 e 18).

O gene da  $\beta_2m$  (165 pb) foi amplificado para ajustar a quantidade de cDNA nas amostras cujo fragmento de interesse apresentava-se menor de 200 pb, caso das isoformas do PR. Portanto, para os genes da *bcl2* e do *ER $\alpha$*  foi utilizado como gene normalizador a  $\beta_2m$  de 623 pb.

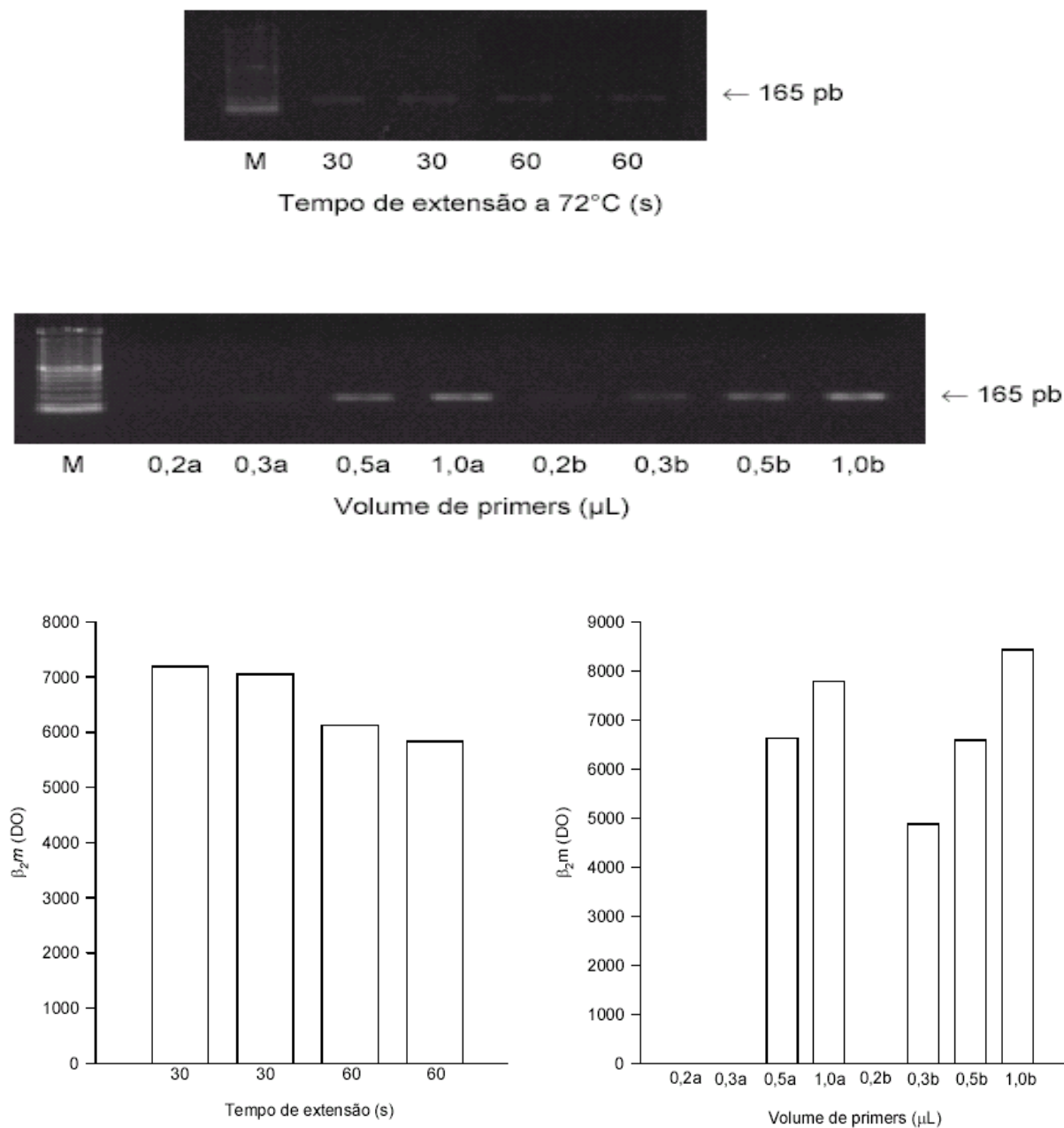


Figura 17 – Padronização da PCR para determinação dos níveis de mRNA da  $\beta_2m$  (165 pb) em tecido endometrial

Todas as curvas de padronização foram realizadas a partir de 4  $\mu\text{g}$  de RNA total. A verificação do tempo de extensão (s) foi processada com 30 ciclos e 6,96 ng de cDNA. A curva de volume de primers ( $\mu\text{L}$ ), com 30 ciclos, foi realizada em duas concentrações distintas de cDNA: (a) 3,48 ng e (b) 6,96 ng. As barras representam unidades arbitrárias de densidade óptica das bandas de 165 pb. M = marcador de peso molecular.

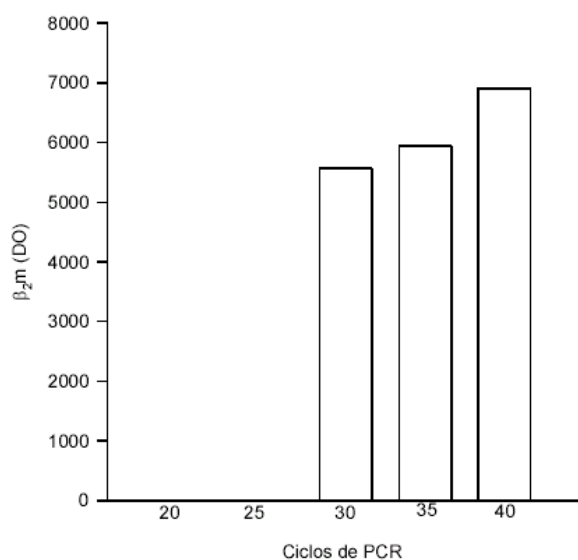
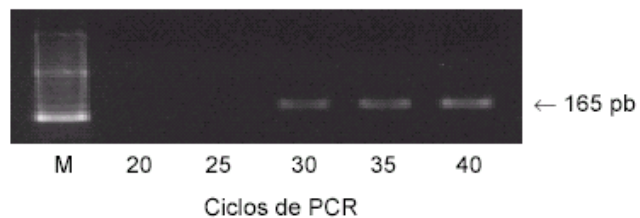


Figura 18 – **Padronização da PCR para determinação dos níveis de mRNA da  $\beta_2m$  (165 pb) em tecido endometrial**

A curva de número de ciclos, a partir de 4  $\mu$ g de RNA total, foi realizada com 3,48 ng de cDNA. As barras representam unidades arbitrárias de densidade óptica das bandas de 165 pb. M = marcador de peso molecular.

## 2.5 Análise Estatística

As reações de PCR para os genes em estudo e as  $\beta_2$ -microglobulina foram processadas em momentos distintos. Os resultados da expressão gênica foram representados com a imagem do gel e, graficamente, como média  $\pm$  erro padrão da média (EP) da relação gene/ $\beta_2m$  a partir da leitura densitométrica das respectivas bandas obtidas em unidades arbitrárias (UA).

Os dados obtidos da expressão gênica foram submetidos à análise estatística com auxílio do programa SPSS-9.0 (Inc., Chicago, IL). As diferenças entre os grupos foram examinadas por análise de variância, seguidas pelo teste de Duncan (ANOVA de uma via). As diferenças consideradas estatisticamente significantes apresentaram  $p < 0,05$ .

## 2.6 Considerações Éticas

O presente projeto de pesquisa foi aprovado em seus aspectos éticos e científicos pelas instituições onde as pacientes consultaram – Hospital de Clínicas de Minas Gerais e Instituto Biocor do Brasil. Todas as pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

### 3 RESULTADOS

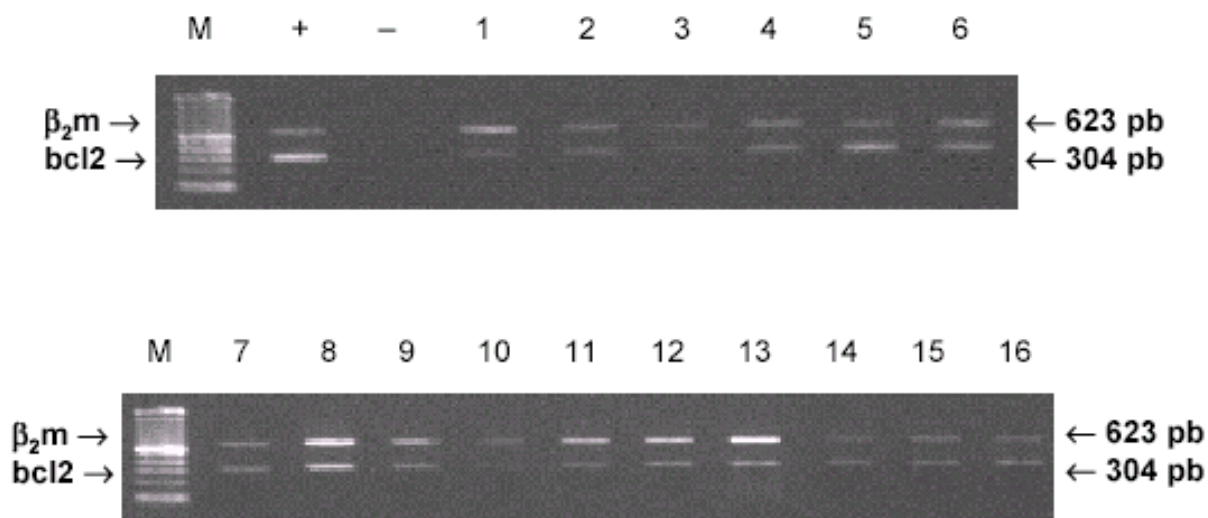
As pacientes inférteis dos grupos sem e com endometriose apresentaram características clínicas similares. A média de idade foi de  $32,9 \pm 0,9$  e  $31,7 \pm 1,5$  anos ( $p = 0,47$ ), respectivamente para o grupo sem e com endometriose. O IMC foi de  $24,0 \pm 0,9$  e  $22,0 \pm 0,7$  kg/m<sup>2</sup> ( $p = 0,08$ ) e a RCQ foi de  $0,85 \pm 0,04$  e  $0,76 \pm 0,02$  ( $p = 0,10$ ). As concentrações circulantes de SHBG também não diferiram entre os grupos ( $47,6 \pm 5,5$  para as pacientes sem endometriose e  $42,8 \pm 4,2$  nmol/L para aquelas com endometriose,  $p = 0,50$ ).

Objetivamos, inicialmente, caracterizar a expressão de genes relacionados ao processo de proliferação celular do endométrio eutópico de mulheres inférteis sem e com endometriose e do implante endometriótico.

Primeiramente, foi realizada a análise de expressão gênica por RT-PCR do protooncogene *B cell lymphoma/leukemia 2 (bcl2)*, apresentada na figura 19. Pode-se observar que todos os 3 grupos (endométrios controle, eutópico e ectópico), coletados em fase proliferativa do ciclo menstrual feminino, expressam o gene para *bcl2*. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados ( $p > 0,05$ ).



A



B

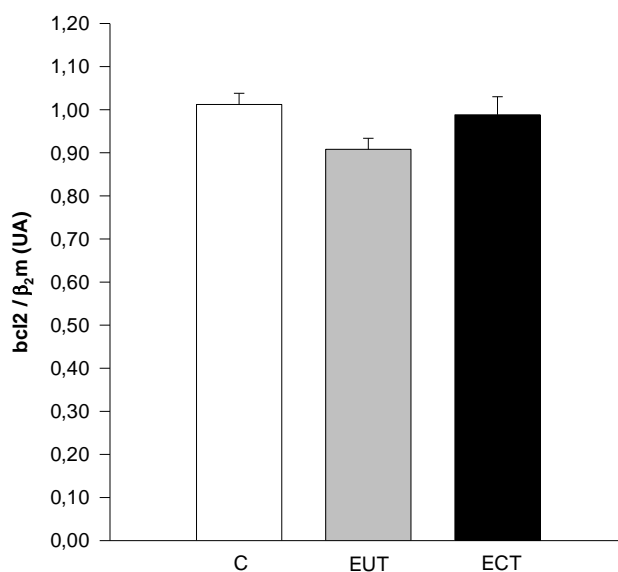
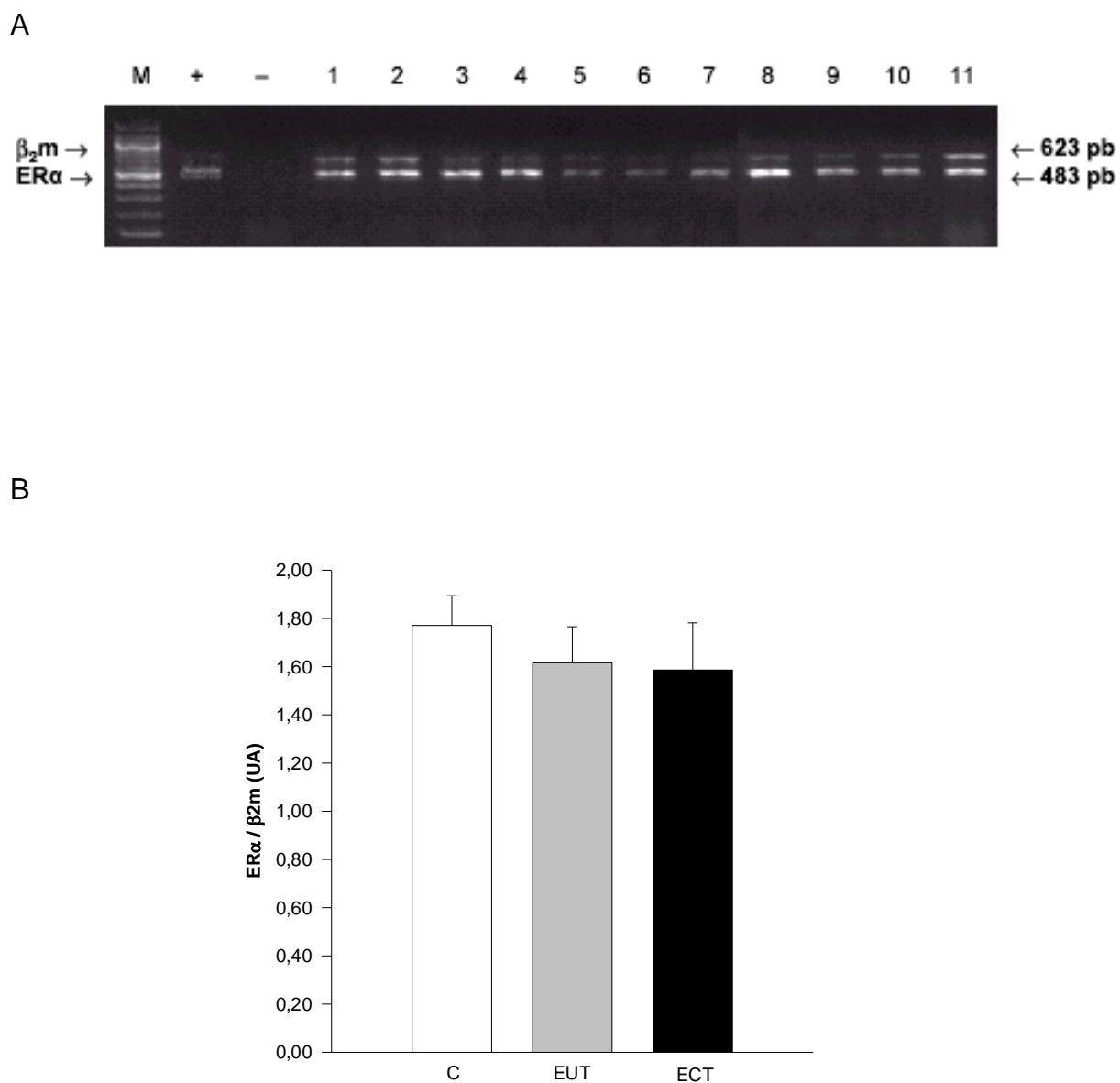


Figura 19 – Níveis do mRNA de *bcl2* (*B cell lymphoma/leukemia 2*) avaliados por RT-PCR em tecido endometrial

(A) Gel representativo: o fragmento de 304 pb corresponde ao mRNA da *bcl2* e o de 623 pb ao da  $\beta_2m$ .  $p = 0,269$ . M = marcador de peso molecular; (+) e (-) representam, respectivamente, controles positivo e negativo. Pacientes controle (C) = linhas 1 a 6; Endométrio eutópico (EUT) = linhas 7 a 9; Endométrio ectópico (ECT) = linhas 10 a 16. (B) O gráfico representa a análise densitométrica das bandas expressa como a relação  $bcl2/\beta_2m$  (média  $\pm$  EP). n: C = 6; EUT = 3; ECT = 7.

Adicionalmente, também foi realizada a análise semiquantitativa de expressão gênica do receptor de estrogênios subtipo  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ). Na figura 20 pode-se observar que os grupos controle, eutópico e ectópico, em fase proliferativa do ciclo menstrual feminino, expressam o gene para  $ER\alpha$ . Não houve diferença significativa entre os grupos estudados ( $p > 0,05$ ).



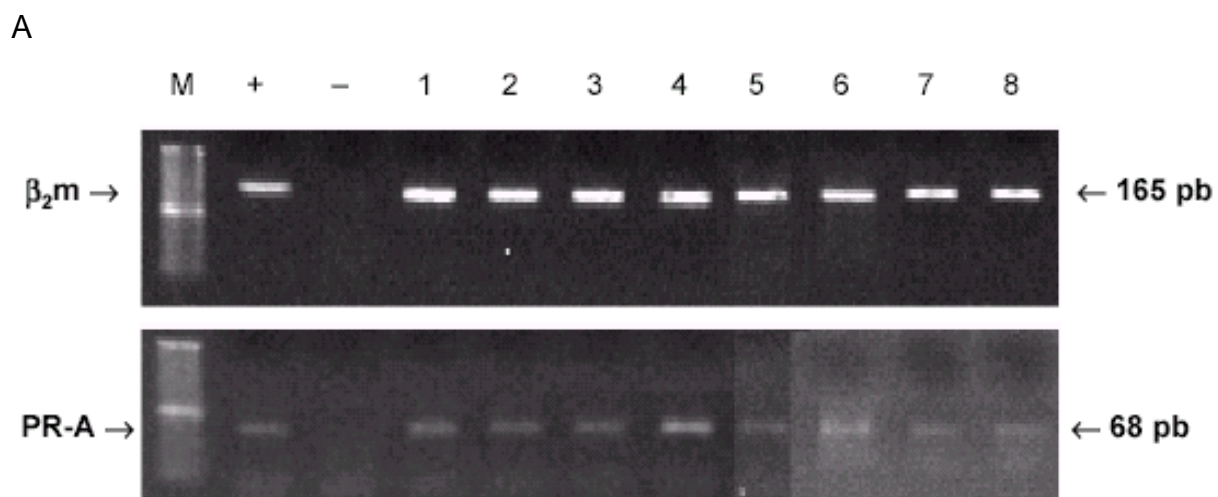
**Figura 20 – Níveis do mRNA do *ERα* (receptor de estrogênios subtipo  $\alpha$ ) avaliados por RT-PCR em tecido endometrial**

(A) Gel representativo: o fragmento de 483 pb corresponde ao mRNA do *ERα* e o de 623 pb ao da  $\beta_2m$ .  $p = 0,649$ . M = marcador de peso molecular; (+) e (-) representam, respectivamente, controles positivo e negativo. Pacientes controle (C) = linhas 1 a 4; Endométrio eutópico (EUT) = linhas 5 a 7; Endométrio ectópico (ECT) = linhas 8 a 11. (B) O gráfico representa a análise densitométrica das bandas expressa como a relação *ERα*/ $\beta_2m$  (média  $\pm$  EP). n: C = 10; EUT = 3; ECT = 5.

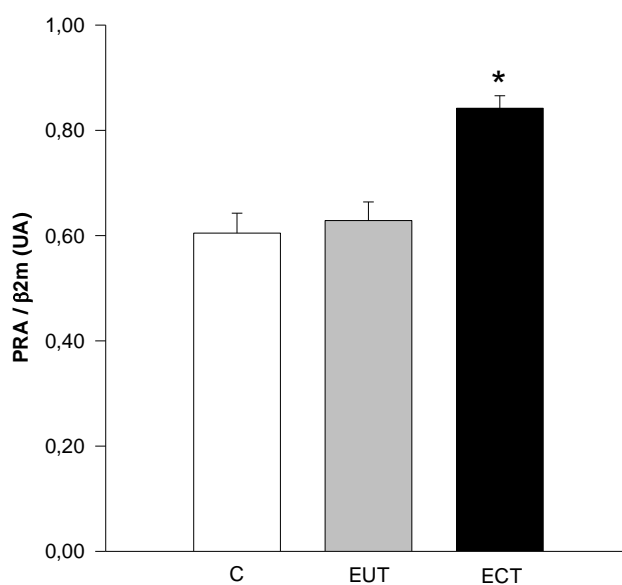
O objetivo seguinte foi o de investigar a expressão de genes associados ao processo de diferenciação celular em endométrio dos grupos controle, eutópico e ectópico. Para tanto, foram realizadas as análises de expressão gênica por RT-PCR dos receptores de progesterona isoformas *A* e *B* (*PR-A* e *PR-B*). Verifica-se que os três grupos estudados expressam os genes relacionados às isoformas do PR, representadas nas figuras 21 e 22.

Conforme observado, na figura 21, a expressão gênica do *PR-A* no endométrio ectópico é significativamente maior em relação aos grupos controle e endométrio eutópico ( $p < 0,05$ ).

Na figura 22, pode-se observar que não houve diferença estatística entre os grupos estudados quanto à expressão do mRNA para o *PR-B* ( $p > 0,05$ ).



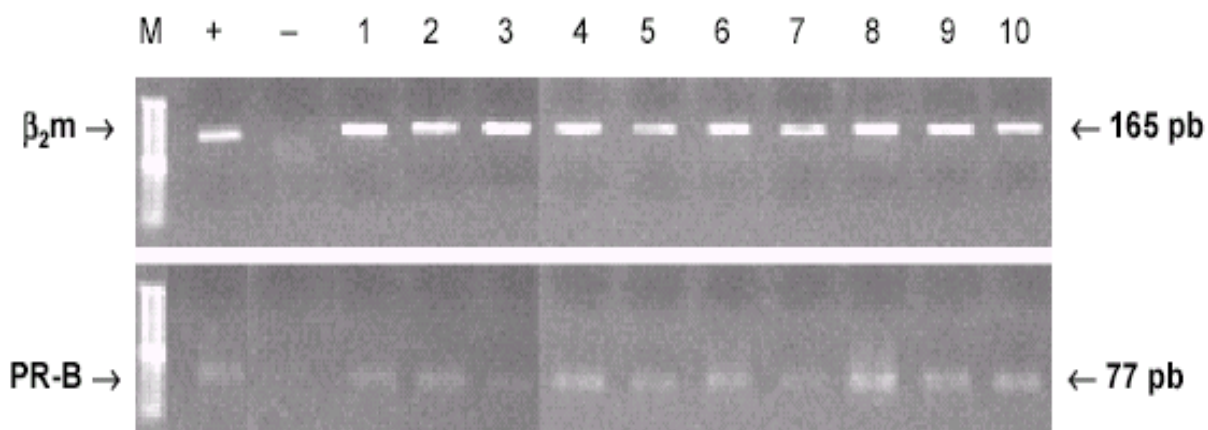
B



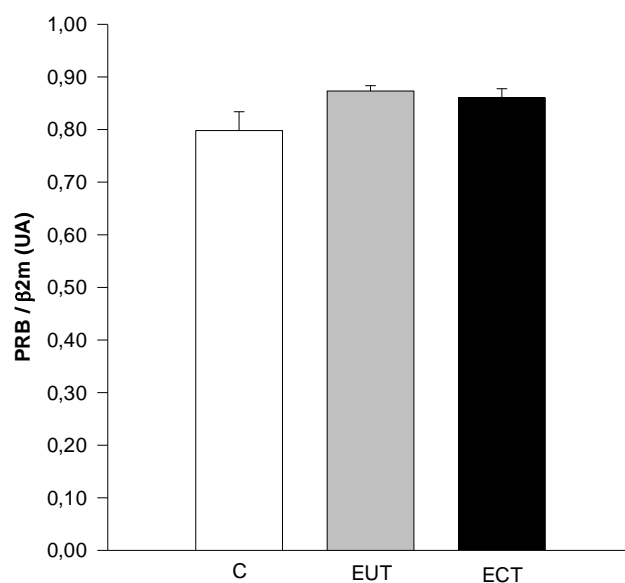
**Figura 21 – Níveis do mRNA de *PR-A* (receptor de progesterona isoforma A) avaliados por RT-PCR em tecido endometrial**

(A) Gel representativo: o fragmento de 68 pb corresponde ao mRNA do *PR-A* e o de 165 pb ao da *β<sub>2</sub>m*. \*p = 0,029. M = marcador de peso molecular; (+) e (-) representam, respectivamente, controles positivo e negativo. Pacientes controle (C) = linhas 1 a 4; Endométrio eutópico (EUT) = linha 5; Endométrio ectópico (ECT) = linhas 6 a 8. (B) O gráfico representa a análise densitométrica das bandas expressa como a relação *PR-A/β<sub>2</sub>m* (média ± EP). n: C = 13; EUT = 2; ECT = 3.

A



B



**Figura 22 – Níveis do mRNA de *PR-B* (receptor de progesterona isoforma *B*) avaliados por RT-PCR em tecido endometrial**

(A) Gel representativo: o fragmento de 77 pb corresponde ao mRNA do *PR-B* e o de 165 pb ao da  $\beta_2m$ .  $p = 0,182$ . M = marcador de peso molecular; (+) e (-) representam, respectivamente, controles positivo e negativo. Pacientes controle (C) = linhas 1 a 3; Endométrio eutópico (EUT) = linhas 4 a 6; Endométrio ectópico (ECT) = linhas 7 a 10. (B) O gráfico representa a análise densitométrica das bandas expressa como a relação *PR-B*/ $\beta_2m$  (média  $\pm$  EP). n: C = 5; EUT = 3; ECT = 4.

Com base nos dados obtidos da expressão de genes relacionados aos processos de proliferação e diferenciação celular em implantes endometrióticos e endométrio eutópico de pacientes inférteis sem e com endometriose, coletados em fase proliferativa do ciclo menstrual, verificou-se significativa correlação negativa entre a expressão gênica de *bcl2* e de *PR-B* ( $r = -0,795$  e  $p = 0,018$ ), apresentada na figura 23.

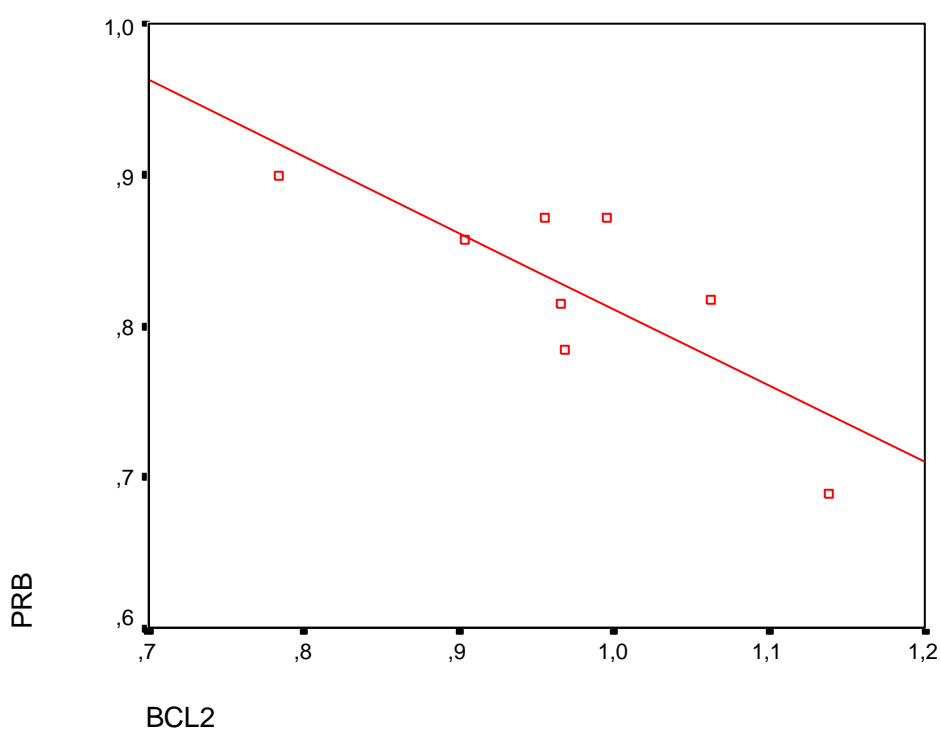


Figura 23 – Correlação entre a expressão gênica de *bcl2* e de *PR-B*

$r = -0,795$ ;  $p = 0,018$ .

## 4 DISCUSSÃO

A endometriose foi descrita, pela primeira vez, há mais de um século, mas ainda hoje existem controvérsias entre os aspectos envolvidos na sua fisiopatogenia. Inúmeros trabalhos na literatura indicam grande variabilidade de dados científicos em relação a causas, desenvolvimento, manutenção e prognóstico da doença. A endometriose vem sendo considerada uma doença multifatorial, visto que o desequilíbrio entre aspectos genéticos, hormonais e imunes estaria relacionado à patologia.

Os hormônios ovarianos são secretados de forma cíclica durante o ciclo menstrual, ocorrendo taxas hormonais distintas entre as fases do mesmo. Por conseguinte, o endométrio também passa por modificações estruturais cíclicas em função das oscilações hormonais ocorridas durante o ciclo menstrual. Os estrogênios são potentes mitógenos para o endométrio, responsáveis pela proliferação celular do tecido. A progesterona, por sua vez, inibe a ação mitogênica do estradiol sobre o endométrio, favorecendo a sua diferenciação celular (Gurates & Bulun, 2003).

No presente estudo, focamos nosso interesse sobre os aspectos moleculares relacionados aos processos de proliferação e diferenciação celular em implantes endometrióticos e endométrio eutópico de mulheres inférteis sem e com endometriose.

Os grupos estudados, controle e endometriose, apresentaram-se semelhantes quanto à idade e às variáveis antropométricas avaliadas. Além disso, os níveis circulantes de SHBG também foram parecidos. Sendo assim, os dois grupos de pacientes eram homogêneos e as diferenças observadas no estudo molecular não podem, portanto, ser consideradas como decorrentes de variações clínicas e demográficas.

O primeiro objetivo do estudo foi o de caracterizar a expressão gênica da *blc2* através da análise semiquantitativa por RT-PCR. Este gene está associado com



mecanismos anti-apoptóticos envolvidos com a proliferação celular. Observou-se, nas condições do presente estudo, que não houve diferença significativa na expressão do mRNA para *bcl2* entre os grupos de endométrio controle, eutópico e ectópico.

Enquanto alguns autores descrevem uma significativa diminuição do índice de apoptose na endometriose; outros não reportam diferenças significativas no índice de apoptose e na expressão de *bcl2* entre o endométrio de pacientes com a doença e o de mulheres controle (Meresman *et al.*, 2000).

A persistência do endométrio proliferativo é acompanhada da expressão de *bcl2* (Critchley *et al.*, 1999). Jones *et al.*, 1998, não encontraram diferenças no percentual de células *bcl2* positivas no endométrio eutópico entre controles e pacientes com endometriose. Contudo, o endométrio ectópico apresentou maior percentual de células *bcl2* positivas na fase proliferativa e no início da fase secretora do ciclo menstrual em pacientes com a doença.

Por outro lado, um aspecto que deve ser comentado a respeito do presente trabalho é que as amostras de endométrio ou implante endometriótico foram colhidas em dias diferentes durante a fase folicular. Isto pode ter influenciado nos níveis de mRNA da *bcl2* observados nos diferentes grupos, uma vez que a expressão deste gene está associada com níveis de estradiol que podem variar muito entre a fase folicular precoce e tardia. Neste sentido, resultados anteriores de nosso grupo mostraram que a expressão gênica de *bcl2* está aumentada em fibroadenomas mamários em comparação com tecido normal, especialmente na fase folicular, e associada à maior expressão do gene do receptor de estrogênios (Cericatto *et al.*, 2005). Assim, estudos adicionais são necessários para avaliar a expressão gênica da *bcl2* em tecido endometrial normal e endometriótico em diferentes fases do ciclo menstrual e sua relação com o receptor de estrogênios.

O papel da apoptose na patofisiologia da endometriose tem-se tornado aparente. Porém, os estudos sobre os processos de apoptose em endométrio de pacientes com endometriose apresentam conclusões conflitantes. Apoptose é um processo celular geral, comum em diferentes situações de proliferação e diferenciação. A apoptose serve para eliminar células danificadas e/ou desnecessárias sem evocar inflamação ou dano tecidual. Autores confirmam o envolvimento da apoptose na patogênese da endometriose (Dufournet *et al.*, 2005). Além disso, observam que a expressão de proteínas envolvidas com o processo varia de acordo com a

localização dos implantes endometrióticos, sugerindo o envolvimento de diferentes mecanismos apoptóticos.

Por outro lado, resultados anteriores de nosso grupo demonstraram aumento significativo da expressão do gene *c-fos* nos implantes endometrióticos em relação ao endométrio controle e eutópico (Morsch *et al.*, 2006 *in press*). O gene *c-fos* tem sido associado à proliferação de células responsivas a estradiol (Crowe *et al.*, 2000). Este mesmo gene codifica uma proteína nuclear que amplifica a mensagem estrogênica, ativando a transcrição de outros genes relacionados ao controle da divisão celular (Weisz & Rosales, 1990). Estes dados, juntamente com os achados de outros autores, reforçam o envolvimento de mecanismos anti-apoptóticos durante a fase proliferativa do ciclo menstrual.

Considerando a influência dos estrogênios sobre a morfologia e função do endométrio e endometriose, buscou-se estudar a expressão de *ER $\alpha$*  nas amostras de mulheres inférteis sem e com endometriose. Os resultados do presente trabalho mostram que o endométrio de mulheres inférteis sem e com endometriose e os implantes endometrióticos expressam o gene do receptor de estrogênios subtipo  $\alpha$  (*ER $\alpha$* ). A constatação do mRNA para *ER $\alpha$*  em endométrio de mulheres inférteis sem e com endometriose e nos implantes endometrióticos confirma que os procedimentos experimentais utilizados garantiram a sensibilidade destes tecidos aos estrogênios. A expressão, por RT-PCR, do gene do *ER $\alpha$*  também não se demonstrou estatisticamente diferente entre os grupos controle, eutópico e ectópico estudados.

Estudos utilizando imuno-histoquímica e hibridização *in situ* para comparar a distribuição de ER total durante as fases do ciclo feminino, em endométrio normal e em implantes endometrióticos, não encontraram diferenças cíclicas neste último grupo (Fujishita *et al.*, 1997). Matsuzaki e seus colaboradores determinaram, pela primeira vez, a expressão do mRNA para *ER $\beta$*  nas lesões endometrióticas durante o ciclo menstrual feminino (Matsuzaki *et al.*, 2000a; Matsuzaki *et al.*, 2000b; Matsuzaki *et al.*, 2001). O grupo também verificou a presença de mRNA para *ER $\alpha$*  em endométrio eutópico normal e em endometriose ovariana e pélvica, independentemente da fase do ciclo menstrual. A expressão gênica de *ER $\beta$*  foi detectada em todas as amostras eutópicas, porém em apenas algumas das acometidas pela endometriose. Por hibridização *in situ* e RT-PCR em tempo real, foi

verificada a diminuição na expressão gênica de  $ER\alpha$  e  $ER\beta$  no endométrio normal em fase secretora. Entretanto, Matsuzaki e colaboradores não observaram a mesma variação nos implantes endometrióticos.

Os achados de Taylor *et al.*, 2005, concordam com outros autores (Dotzlaw *et al.*, 1997; Harris *et al.*, 2005), segundo os quais há uma predominância na expressão do receptor de estrogênios subtipo  $\alpha$  no endométrio, sugerindo ser o  $ER\alpha$  essencial para o desenvolvimento e crescimento deste tecido, e conseqüentemente, para manutenção das lesões típicas da doença. Estudos sugerem que o  $ER\beta$  tenha propriedades anti-proliferativas ou até mesmo não-proliferativas em determinados órgãos endócrinos, incluindo-se o endométrio (Dotzlaw *et al.*, 1997; Harris *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2005).

Os achados de Hudelist e colaboradores, porém, são discordantes. Através de imuno-histoquímica, reportam níveis significativamente maiores de mRNA para  $ER\beta$  nas lesões endometrióticas em relação à expressão local de  $ER\alpha$ , sugerindo que os efeitos estrogênicos são primeiramente mediados via o subtipo  $\beta$  neste tecido (Hudelist *et al.*, 2005).

No presente estudo, os resultados da expressão de genes relacionados aos processos de proliferação celular não foram diferentes entre os três grupos estudados (controle, eutópico e ectópico). Um aspecto que deve ser salientado é que apesar de todas as amostras terem sido coletadas durante a fase proliferativa do ciclo endometrial de cada paciente, as biópsias foram realizadas em dias diferentes dentro deste período do ciclo. Assim, é possível que os resultados de mRNA obtidos possam ter sido influenciados por esta variação na coleta das amostras de endométrio, refletindo a resposta do tecido endometrial às flutuações hormonais que podem ter ocorrido ao longo da fase folicular.

A expressão de genes associados aos processos de diferenciação celular e à influência do estradiol também foi investigada no presente trabalho. Iniciamos com a análise da expressão gênica do receptor de progesterona isoforma A ( $PR-A$ ) através da quantificação de seu mRNA por RT-PCR. Verificou-se que o endométrio ectópico mostrou uma maior expressão para o gene do  $PR-A$  em relação aos grupos controle e eutópico. O  $PR-A$  interfere nos processos de transcrição gênica, bloqueando a resposta nuclear ao complexo receptor-hormônio esteróide, sendo considerado o repressor dominante do  $PR-B$ , além de interferir na resposta também de outros

receptores esteróides (Vegeto *et al.*, 1993; McDonnell *et al.*, 1994; Wen *et al.*, 1994; Giangrande *et al.*, 2000).

Por outro lado, os resultados do presente trabalho quanto à expressão do mRNA para *PR-B* no endométrio das mulheres inférteis sem e com endometriose e nos implantes endometrióticos não demonstraram diferenças significativas entre os grupos controle, eutópico e ectópico.

Parecem existir concentrações estequiométricas de *PR-A* e *PR-B* na maioria dos tecidos. Ambas as isoformas de PR estão presentes no endométrio. Durante o ciclo menstrual, encontram-se níveis equivalentes de *PR-A* e *PR-B* no compartimento epitelial do endométrio, enquanto no estromal a expressão de *PR-A* é predominante (Sereepapong *et al.*, 2004). Entretanto, em determinadas condições endócrinas a razão entre estas isoformas pode variar. Sakaguchi *et al.*, 2004, constataram, em células de câncer de endométrio, que quanto menor os níveis de mRNA para *PR-B* pior o prognóstico para paciente. Concluíram então, a partir de tecido endometrial sem e com câncer, que um bom prognóstico estaria relacionado à razão estequiométrica de *PR-B/PR* total próximo de um.

Igarashi e colaboradores indicam que a diminuição da proporção *PR-B/PR-A*, medida por *Western blott* no tecido endometrial de mulheres com endometriose, deve-se a alterações na isoforma *B* (Igarashi *et al.*, 2005). Os autores defendem que a redução na sensibilidade à progesterona leva ao desequilíbrio da regulação gênica e ao descompasso na síntese de várias proteínas, inclusive enzimas, como pode ser observado na doença.

De acordo com o estudo de Attia *et al.*, 2000, as duas isoformas do PR, medidas por *Western blott* são detectáveis em endométrio eutópico, sendo a variação cíclica dos níveis de *PR-A* menos evidente que a do *PR-B*. Verifica-se apenas a presença de *PR-A* no endométrio ectópico, em concentração e variação ainda menores às observadas no endométrio eutópico.

Em pacientes com endometriose, enquanto transcritos de ambas isoformas do receptor de progesterona (*PR-A* e *PR-B*) são detectáveis no endométrio eutópico, onde parecem estar desreguladas; somente transcritos do *PR-A* estão presentes nos implantes de endométrio ectópico. A presença da isoforma inibitória – *PR-A* – e a ausência do *PR-B* sugerem uma possível explicação para a resistência à progesterona verificada no endométrio ectópico (Attia *et al.*, 2000; Gurates & Bulun, 2003; Giudice & Kao, 2004).

No presente trabalho, a expressão do mRNA para *PR-B* não foi significativamente diferente entre os grupos estudados, provavelmente pelo número reduzido de amostras analisadas. Entretanto, encontramos forte correlação negativa entre a expressão gênica de *bcl2* e *PR-B* ( $r = - 0,795$  e  $p = 0,018$ ). Estes dados corroboram com o papel da progesterona como anti-mitogênica sobre o endométrio, favorecendo a sua diferenciação celular.

A expressão local dos receptores de estrogênio (ER) e de progesterona (PR) é regulada pelos esteróides durante as diferentes fases do ciclo menstrual feminino. Por conseguinte, a proporção entre a expressão de ER e PR, bem como entre a expressão das suas diferentes isoformas, no endométrio, podem determinar a resposta tecidual frente a estrogênios e progesterona respectivamente (Sereepapong *et al.*, 2004). Além disso, na endometriose, a resistência tecidual do endométrio à ação progestogênica pode estar relacionada à funcionalidade dos receptores de progesterona.

A endometriose representa um modelo de doença humana onde hormônios, citocinas e sistema imune influenciam um ao outro (Matarese *et al.*, 2003).

A co-existência dos receptores de estrogênios e progesterona pode sugerir que as ações estrogênicas e progestogênicas estejam integralmente associadas ao efeito modulatório do *PR-A*. Assim sendo, o *PR-A* pode estar facilitando o “cross-talk” entre os mecanismos de sinalização destes hormônios esteróides nos tecidos responsivos aos mesmos (Wen *et al.*, 1994).

Em acordo, podemos concluir, com o presente trabalho, que devem existir mecanismos de modulação entre aspectos hormonais e imunes na endometriose. Devido à natureza do método de análise utilizado neste trabalho, estudos adicionais, bem como a análise da expressão gênica para o *ER $\beta$* , serão necessários para complementação dos resultados.

## 5 CONCLUSÕES

- Os dados obtidos no presente trabalho demonstram que o endométrio de mulheres inférteis sem e com endometriose constituem um tecido responsivo aos hormônios sexuais esteróides, visto termos detectado, por análise de expressão gênica, a presença do mRNA para os receptores de estrogênio e progesterona nos três grupos estudados.
- O protooncogene da *bcl2* foi expresso no endométrio eutópico das pacientes sem e com endometriose e nos implantes endometrióticos. Contudo, nas condições experimentais do presente estudo não foi observada diferença estatística na expressão gênica de *bcl2* entre os grupos.
- A expressão do gene do  $ER\alpha$  endometrial foi similar entre os grupos controle, eutópico e ectópico.
- O endométrio ectópico apresentou níveis de mRNA mais elevados para *PR-A* em relação aos grupos controle e eutópico.
- A expressão gênica do *PR-B* não foi significativamente diferente entre os grupos do presente trabalho. Entretanto, houve forte correlação negativa entre a expressão dos genes *bcl2* e *PR-B* nas amostras de endométrio sem e com endometriose, em fase proliferativa do ciclo menstrual, sugerindo que um papel anti-proliferativo do PR-B possa ser operativo neste modelo experimental.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Attar E & Bulun SE (2006) Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects. *Hum Reprod Update* **12**, 49-56.
- Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR & Bulun SE (2000) Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 2897-2902.
- Brum IS, Morsch DM, Pozzobon A, Boeri VA, Geib G & Spritzer PM (2003) Androgen-dependent expression of c-jun and c-fos in human non-transformed epithelial prostatic cells: association with cell proliferation. *Horm Res* **60**, 209-214.
- Bulun SE, Mahendroo MS & Simpson ER (1993) Polymerase chain reaction amplification fails to detect aromatase cytochrome P450 transcripts in normal human endometrium or decidua. *J Clin Endocrinol Metab* **76**, 1458-1463.
- Bulun SE, Simpson ER & Word RA (1994) Expression of the CYP19 gene and its product aromatase cytochrome P450 in human uterine leiomyoma tissues and cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* **78**, 736-743.
- Bulun SE, Yang S, Fang Z, Gurates B, Tamura M, Zhou J & Sebastian S (2001) Role of aromatase in endometrial disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* **79**, 19-25.
- Bulun SE, Zeitoun K, Takayama K, Noble L, Michael D, Simpson E, Johns A, Putman M & Sasano H (1999) Estrogen production in endometriosis and use of aromatase inhibitors to treat endometriosis. *Endocr Relat Cancer* **6**, 293-301.
- Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K & Sasano H (2000a) Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance. *J Mol Endocrinol* **25**, 35-42.
- Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K & Sasano H (2000b) Molecular basis for treating endometriosis with aromatase inhibitors. *Hum Reprod Update* **6**, 413-418.
- Cericatto R, Pozzobon A, Morsch DM, Menke CH, Brum IS & Spritzer PM (2005) Estrogen receptor-alpha, bcl-2 and c-myc gene expression in fibroadenomas and adjacent normal breast: association with nodule size, hormonal and reproductive features. *Steroids* **70**, 153-160.
- Chabbert-Buffet N, Meduri G, Bouchard P & Spitz IM (2005) Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications. *Hum Reprod Update* **11**, 293-307.
- Chen Y, Kayano T & Takagi M (2000) Dysregulated expression of bcl-2 and bax in oral carcinomas: evidence of post-transcriptional control. *J Oral Pathol Med* **29**, 63-69.
- Conneely OM & Lydon JP (2000) Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids* **65**, 571-577.
- Conneely OM, Maxwell BL, Toft DO, Schrader WT & O'Malley BW (1987) The A and B forms of the chicken progesterone receptor arise by alternate initiation of translation of a unique mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **149**, 493-501.

- Conneely OM, Mulac-Jericevic B & Lydon JP (2003) Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* **68**, 771-778.
- Critchley HO, Tong S, Cameron ST, Drudy TA, Kelly RW & Baird DT (1999) Regulation of bcl-2 gene family members in human endometrium by antiprogestin administration in vivo. *J Reprod Fertil* **115**, 389-395.
- Crowe DL, Brown TN, Kim R, Smith SM & Lee MK (2000) A c-fos/Estrogen receptor fusion protein promotes cell cycle progression and proliferation of human cancer cell lines. *Mol Cell Biol Res Commun* **3**, 243-248.
- Davies S, Dai D, Wolf DM & Leslie KK (2004) Immunomodulatory and transcriptional effects of progesterone through progesterone A and B receptors in Hec50co poorly differentiated endometrial cancer cells. *J Soc Gynecol Investig* **11**, 494-499.
- Dheenadayalu K, Mak I, Gordts S, Campo R, Higham J, Puttemans P, White J, Christian M, Fusi L & Brosens J (2002) Aromatase P450 messenger RNA expression in eutopic endometrium is not a specific marker for pelvic endometriosis. *Fertil Steril* **78**, 825-829.
- Dotzlaw H, Leygue E, Watson PH & Murphy LC (1997) Expression of estrogen receptor-beta in human breast tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 2371-2374.
- Dufournet C, Uzan C, Fauvet R, Cortez A, Siffroi JP & Darai E (2005) Expression of apoptosis-related proteins in peritoneal, ovarian and colorectal endometriosis. *J Reprod Immunol*.
- Enmark E & Gustafsson JA (1999) Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med* **246**, 133-138.
- Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjold M & Gustafsson JA (1997) Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 4258-4265.
- Fauconnier A & Chapron C (2005) Endometriosis and pelvic pain: epidemiological evidence of the relationship and implications. *Hum Reprod Update* **11**, 595-606.
- Feil PD, Clarke CL & Satyaswaroop PG (1988) Progestin-mediated changes in progesterone receptor forms in the normal human endometrium. *Endocrinology* **123**, 2506-2513.
- Ferrero S, Abbamonte LH, Anserini P, Remorgida V & Ragni N (2005a) Future Perspectives in the Medical Treatment of Endometriosis. *Obstet Gynecol Surv* **60**, 817-826.
- Ferrero S, Esposito F, Abbamonte LH, Anserini P, Remorgida V & Ragni N (2005b) Quality of sex life in women with endometriosis and deep dyspareunia. *Fertil Steril* **83**, 573-579.
- Fujishita A, Nakane PK, Koji T, Masuzaki H, Chavez RO, Yamabe T & Ishimaru T (1997) Expression of estrogen and progesterone receptors in endometrium and peritoneal endometriosis: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Fertil Steril* **67**, 856-864.
- Garcia E, Bouchard P, De Brux J, Berdah J, Frydman R, Schaison G, Milgrom E & Perrot-Applanat M (1988) Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating. *J Clin Endocrinol Metab* **67**, 80-87.



- Giangrande PH, Kimbrel EA, Edwards DP & McDonnell DP (2000) The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. *Mol Cell Biol* **20**, 3102-3115.
- Giudice LC & Kao LC (2004) Endometriosis. *Lancet* **364**, 1789-1799.
- Gompel A, Sabourin JC, Martin A, Yaneva H, Audouin J, Decroix Y & Poitout P (1994) Bcl-2 expression in normal endometrium during the menstrual cycle. *Am J Pathol* **144**, 1195-1202.
- Goumenou AG, Matalliotakis IM, Tzardi M, Fragouli YG, Mahutte NG & Arici A (2004) Apoptosis and differential expression of apoptosis-related proteins in endometriotic glandular and stromal cells. *J Soc Gynecol Investig* **11**, 318-322.
- Graham JD & Clarke CL (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* **18**, 502-519.
- Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y & Shine J (1986) Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* **231**, 1150-1154.
- Gronemeyer H, Meyer ME, Bocquel MT, Kastner P, Turcotte B & Chambon P (1991) Progesterin receptors: isoforms and antihormone action. *J Steroid Biochem Mol Biol* **40**, 271-278.
- Groothuis PG, Nap AW, Winterhager E & Grummer R (2005) Vascular development in endometriosis. *Angiogenesis* **8**, 147-156.
- Gurates B & Bulun SE (2003) Endometriosis: the ultimate hormonal disease. *Semin Reprod Med* **21**, 125-134.
- Harris HA, Bruner-Tran KL, Zhang X, Osteen KG & Lyttle CR (2005) A selective estrogen receptor-beta agonist causes lesion regression in an experimentally induced model of endometriosis. *Hum Reprod* **20**, 936-941.
- Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD & Korsmeyer SJ (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**, 334-336.
- Hockenbery DM (1995) bcl-2, a novel regulator of cell death. *Bioessays* **17**, 631-638.
- Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M & Korsmeyer SJ (1991) BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6961-6965.
- Horwitz KB & Alexander PS (1983) In situ photolinked nuclear progesterone receptors of human breast cancer cells: subunit molecular weights after transformation and translocation. *Endocrinology* **113**, 2195-2201.
- Horwitz KB, Wei LL & Francis MD (1986) Structural analyses of progesterone receptors. *J Steroid Biochem* **24**, 109-117.
- Huang J, Shi YF & Zhou CY (2005) [Expressions of aromatase P450 and estrogen receptor in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and their correlation with endometriosis]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* **40**, 171-174.
- Hudelist G, Keckstein J, Czerwenka K, Lass H, Walter I, Auer M, Wieser F, Wenzl R, Kubista E & Singer CF (2005) Estrogen receptor beta and matrix metalloproteinase 1 are coexpressed in uterine endometrium and endometriotic lesions of patients with endometriosis. *Fertil Steril* **84 Suppl 2**, 1249-1256.
- Igarashi TM, Bruner-Tran KL, Yeaman GR, Lessey BA, Edwards DP, Eisenberg E & Osteen KG (2005) Reduced expression of progesterone receptor-B in the endometrium of women with endometriosis and in cocultures of endometrial cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fertil Steril* **84**, 67-74.

- Jones RK, Bulmer JN & Searle RF (1998) Phenotypic and functional studies of leukocytes in human endometrium and endometriosis. *Hum Reprod Update* **4**, 702-709.
- Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, Osteen K, Lessey BA & Giudice LC (2003) Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* **144**, 2870-2881.
- Kastner P, Bocquel MT, Turcotte B, Garnier JM, Horwitz KB, Chambon P & Gronemeyer H (1990a) Transient expression of human and chicken progesterone receptors does not support alternative translational initiation from a single mRNA as the mechanism generating two receptor isoforms. *J Biol Chem* **265**, 12163-12167.
- Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H & Chambon P (1990b) Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *Embo J* **9**, 1603-1614.
- Kitawaki J, Kado N, Ishihara H, Koshiba H, Kitaoka Y & Honjo H (2002) Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* **83**, 149-155.
- Kitawaki J, Koshiba H, Ishihara H, Kusuki I, Tsukamoto K & Honjo H (2000) Progesterone induction of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 during the secretory phase occurs in the endometrium of estrogen-dependent benign diseases but not in normal endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 3292-3296.
- Kitawaki J, Noguchi T, Amatsu T, Maeda K, Tsukamoto K, Yamamoto T, Fushiki S, Osawa Y & Honjo H (1997) Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biol Reprod* **57**, 514-519.
- Koehler KF, Helguero LA, Haldosen LA, Warner M & Gustafsson JA (2005) Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr Rev* **26**, 465-478.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S & Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138**, 863-870.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S & Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5925-5930.
- Kuiper GG & Gustafsson JA (1997) The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett* **410**, 87-90.
- Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR & Chambon P (1987) Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* **51**, 941-951.
- Li H & Yuan J (1999) Deciphering the pathways of life and death. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 261-266.
- Mangal RK, Wiehle RD, Poindexter AN, 3rd & Weigel NL (1997) Differential expression of uterine progesterone receptor forms A and B during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem Mol Biol* **63**, 195-202.

- Matarese G, De Placido G, Nikas Y & Alviggi C (2003) Pathogenesis of endometriosis: natural immunity dysfunction or autoimmune disease? *Trends Mol Med* **9**, 223-228.
- Matsuzaki S, Fukaya T, Uehara S, Murakami T, Sasano H & Yajima A (2000a) Characterization of messenger RNA expression of estrogen receptor-alpha and -beta in patients with ovarian endometriosis. *Fertil Steril* **73**, 1219-1225.
- Matsuzaki S, Murakami T, Uehara S, Canis M, Sasano H & Okamura K (2001) Expression of estrogen receptor alpha and beta in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertil Steril* **75**, 1198-1205.
- Matsuzaki S, Uehara S, Murakami T, Fujiwara J, Funato T & Okamura K (2000b) Quantitative analysis of estrogen receptor alpha and beta messenger ribonucleic acid levels in normal endometrium and ovarian endometriotic cysts using a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Fertil Steril* **74**, 753-759.
- McDonnell DP & Goldman ME (1994) RU486 exerts antiestrogenic activities through a novel progesterone receptor A form-mediated mechanism. *J Biol Chem* **269**, 11945-11949.
- McDonnell DP, Shahbaz MM, Vegeto E & Goldman ME (1994) The human progesterone receptor A-form functions as a transcriptional modulator of mineralocorticoid receptor transcriptional activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* **48**, 425-432.
- Medicine TPCotASfR (2004) Endometriosis and infertility. *Fertil Steril* **82 Suppl 1**, S40-45.
- Meresman GF, Auge L, Baranao RI, Lombardi E, Tesone M & Sueldo C (2002) Oral contraceptives suppress cell proliferation and enhance apoptosis of eutopic endometrial tissue from patients with endometriosis. *Fertil Steril* **77**, 1141-1147.
- Meresman GF, Vighi S, Buquet RA, Contreras-Ortiz O, Tesone M & Rumi LS (2000) Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis. *Fertil Steril* **74**, 760-766.
- Morsch DM, Carneiro MM, Araújo FC, Camargos AF, Reis FM & Spritzer PM (2006) c-fos gene expression in pelvic endometriosis: a local marker of estrogen action beyond 17bHSD2.
- Mulac-Jericevic B & Conneely OM (2004) Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* **128**, 139-146.
- Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP & Conneely OM (2000) Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* **289**, 1751-1754.
- Mylonas I, Jeschke U, Shabani N, Kuhn C, Kriegel S, Kupka MS & Friese K (2005) Normal and malignant human endometrium express immunohistochemically estrogen receptor alpha (ER-alpha), estrogen receptor beta (ER-beta) and progesterone receptor (PR). *Anticancer Res* **25**, 1679-1686.
- Nishida M, Nasu K, Ueda T, Fukuda J, Takai N & Miyakawa I (2005) Endometriotic cells are resistant to interferon-gamma-induced cell growth inhibition and apoptosis: a possible mechanism involved in the pathogenesis of endometriosis. *Mol Hum Reprod* **11**, 29-34.
- Noble LS, Simpson ER, Johns A & Bulun SE (1996) Aromatase expression in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 174-179.
- Oehler MK, Rees MC & Bicknell R (2000) Steroids and the endometrium. *Curr Med Chem* **7**, 543-560.

- Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ & Scanlan TS (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* **277**, 1508-1510.
- Parazzini F, Bertulesi C, Pasini A, Rosati M, Di Stefano F, Shonauer S, Vicino M, Aguzzoli L, Trossarelli GF, Massobrio M, Bracco G, Perino A, Moroni S & Beretta P (2005) Determinants of short term recurrence rate of endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **121**, 216-219.
- Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F, Pozzan T & Rizzuto R (2001) The Ca<sup>2+</sup> concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *Embo J* **20**, 2690-2701.
- Sakaguchi H, Fujimoto J, Hong BL, Nakagawa Y & Tamaya T (2004) Drastic decrease of progesterone receptor form B but not A mRNA reflects poor patient prognosis in endometrial cancers. *Gynecol Oncol* **93**, 394-399.
- Saunders PT (1998) Oestrogen receptor beta (ER beta). *Rev Reprod* **3**, 164-171.
- Scarselli G, Rizzello F, Cammilli F, Ginocchini L & Coccia ME (2005) Diagnosis and treatment of endometriosis. A review. *Minerva Ginecol* **57**, 55-78.
- Schuchard M, Landers JP, Sandhu NP & Spelsberg TC (1993) Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocr Rev* **14**, 659-669.
- Sereepapong W, Chotnopparatpattara P, Taneepanichskul S, Markham R, Russell P & Fraser IS (2004) Endometrial progesterone and estrogen receptors and bleeding disturbances in depot medroxyprogesterone acetate users. *Hum Reprod* **19**, 547-552.
- Simoncini T & Genazzani AR (2003) Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol* **148**, 281-292.
- Simpson ER, Zhao Y, Agarwal VR, Michael MD, Bulun SE, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Sun T, Fisher CR, Qin K & Mendelson CR (1997) Aromatase expression in health and disease. *Recent Prog Horm Res* **52**, 185-213; discussion 213-184.
- Simpson JL (2002) Molecular approach to common causes of female infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **16**, 685-702.
- Simpson JL (2005) Where are the genes that cause endometriosis? *J Soc Gynecol Investig* **12**, 143-144.
- Snijders MP, de Goeij AF, Debets-Te Baerts MJ, Rousch MJ, Koudstaal J & Bosman FT (1992) Immunocytochemical analysis of oestrogen receptors and progesterone receptors in the human uterus throughout the menstrual cycle and after the menopause. *J Reprod Fertil* **94**, 363-371.
- Taplin ME, Bublej GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, Keer HN & Balk SP (1995) Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* **332**, 1393-1398.
- Taylor AH, Guzail M, Wahab M, Thompson JR & Al-Azzawi F (2005) Quantitative histomorphometric analysis of gonadal steroid receptor distribution in the normal human endometrium through the menstrual cycle. *Histochem Cell Biol* **123**, 463-474.
- Ulrich U & Keckstein J (2005) [Diagnosing endometriosis]. *Zentralbl Gynakol* **127**, 295-298.
- Ulukus M & Arici A (2005) Immunology of endometriosis. *Minerva Ginecol* **57**, 237-248.
- Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW & McDonnell DP (1993) Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific

- repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* **7**, 1244-1255.
- Weisz A & Rosales R (1990) Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Nucleic Acids Res* **18**, 5097-5106.
- Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME & McDonnell DP (1994) The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol Cell Biol* **14**, 8356-8364.
- Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, Suzuki T, Moghrabi N, Andersson S, Johns A, Meng L, Putman M, Carr B & Bulun SE (1998) Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17beta-estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 4474-4480.
- Zeitoun KM & Bulun SE (1999) Aromatase: a key molecule in the pathophysiology of endometriosis and a therapeutic target. *Fertil Steril* **72**, 961-969.
- Zhou HE & Nothnick WB (2005) The relevancy of the matrix metalloproteinase system to the pathophysiology of endometriosis. *Front Biosci* **10**, 569-575.